



Çeşitli İlaç Etken Maddelerinin Kapiler Elektrokromatografi ile Tayini için Yeni Kapiler Kolonlar Geliştirilmesi

Program Kodu: 1001

Proje No: 215Z205

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Ahmet E. EROĞLU

Araştırmacı(lar):

Dr. Öğr. Üyesi Ümit Hakan YILDIZ
Dr. Öğr. Üyesi Engin KARABUDAK

Danışman(lar):

Prof. Dr. Ali ÇAĞIR

Bursiyer(ler):

Cemre YAŞAR
Elif GÜREL
Özge ULAMIŞLI EMMEZ

**ARALIK 2018
İZMİR**



ÖNSÖZ

TÜBİTAK tarafından '1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı' kapsamında 215Z205 koduyla desteklenmiş olan projede, çeşitli ilaç etken maddelerine seçici malzemeler geliştirilip kapiler elektrokromatografi (CEC)'de durağan faz olarak kullanılması amaçlanmıştır. Sentezlenen yeni kaplama malzemelerinin amaca uygunluğu, seçiciliği ve sorpsiyon performansı yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) ile incelenmiştir. Söz konusu malzemeler, anti-kanser ilaç etken maddeleri, diüretikler ve beta-blokerlerin tayini için CEC kolon kaplaması/durağan faz olarak kullanılmıştır.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar	vi
ŞEKİLLER.....	vii
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Kapiler Elektrokforez ve Kapiler Elektrokromatografi	1
1.1.1 Kapiler Elektrokromatografide Durağan Fazlar.....	3
1.2 Önerilen Kaplama Malzemeleri.....	5
1.2.1 Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP).....	5
1.2.2 Silan Kimyası ve Sol-Jel Temelleri	6
1.3 Hedef Analit Grupları	7
1.3.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri.....	7
1.3.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri.....	9
1.3.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri.....	11
1.4 Çalışmanın Amacı	13
BÖLÜM 2	14
GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
2.1 Enstrümantasyon	14
2.1.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri.....	14
2.1.1.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları	14
2.1.1.2 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları.....	15
2.1.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri.....	16
2.1.2.1 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları	16
2.1.2.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları.....	17
2.1.3 Diüretik İlaç Etken Maddeleri.....	17
2.1.3.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD çalışmaları.....	17
2.1.3.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD çalışmaları	18
2.1.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri.....	19
2.1.4.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD çalışmaları	19
2.1.4.2. β -bloker İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD çalışmaları	19
2.2 Kaplama Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu	20



2.2.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri.....	20
2.2.1.1 Akrilamid ile Monolitik MIP/NIP Sentezi	20
2.2.1.2 Metakrilik Asit ile Monolitik MIP/NIP Sentezi	22
2.2.1.3 Metakrilik Asit ile MIP/NIP Mikro/Nano Küreciklerin Sentezi	23
2.2.1.4 Geri Bağlanma Deneyleri.....	23
2.2.1.5 Seçicilik Deneyleri	23
2.2.1.6 Katı Faz Ekstraksiyon ile Kaplama Malzemesi Karakterizasyonu	24
2.2.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri	24
2.2.2.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi	24
2.2.2.2 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Silikat Sorbentlerin Yüzey Modifikasyonu	26
2.2.2.3 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu.....	27
2.2.2.4 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri	28
2.2.2.5 Organik Bazlı MIP/NIP Sentezi.....	28
2.2.2.6 İnorganik Bazlı MIIP/NIIP Sentezi.....	29
2.2.2.7 Moleküler Baskılama Metodu ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu.....	30
2.2.2.8 Geri Bağlanma Deneyleri.....	30
2.2.2.9 Seçicilik Deneyleri	31
2.2.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri	31
2.2.3.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi	31
2.2.3.2 Sol-jel Senteziyle Üretilen Silikat Sorbentin Karakterizasyonu	32
2.2.3.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için MIP/NIP Sentezi	33
2.2.3.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Organik Bazlı MIP/NIP.....	33
2.2.3.5 β -blokerler için İnorganik Bazlı MIIP/NIIP	34
2.2.3.6 β -blokerler için Sentezlenen MIP/NIP'lerin Karakterizasyonu	34
2.2.3.7 Geri Bağlanma Deneyleri.....	35
2.2.3.8 Seçicilik Deneyleri	35
2.2.3.9 Elementel Analiz.....	36
2.3 Kapiler Kolon Kaplama ve Karakterizasyonu	36
2.3.1 Sol-jel Yöntemi ile Kapiler Kolon Kaplama	36
2.3.2 Moleküler Baskılama ile Kapiler Kolon Kaplama	37
BÖLÜM 3	39
BULGULAR VE TARTIŞMA	39
3.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri	39
3.1.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları.....	39
3.1.2 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları	40
3.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri	41

3.2.1 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları.....	41
3.2.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları	42
3.3 Diüretik İlaç Etken Maddeleri	42
3.3.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları	42
3.3.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları	43
3.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri	45
3.4.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları.....	45
3.4.2 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları	45
3.5 Kaplama Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu	48
3.5.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için MIP/NIP Sentezi.....	48
3.5.1.1 Monolitik ve Mikro/Nano Kürecik MIP/NIP Karakterizasyonu	48
3.5.1.2 Geri Bağlanma Deneyleri.....	49
3.5.1.3 Seçicilik Deneyleri	52
3.5.1.4 Katı Faz Ekstraksiyon ile Kaplama Malzemesi Karakterizasyonu	53
3.5.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri	57
3.5.2.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi	57
3.5.2.2 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Silikat Sorbentlerin Yüzey Modifikasyonu	60
3.5.2.3 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu.....	61
3.5.2.4 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri.....	62
3.5.2.5 Organik Bazlı MIP/NIP Sentezi	62
3.5.2.6 İnorganik Bazlı MIIP/NIIP Sentezi.....	63
3.5.2.7 Moleküler Baskılama Metodu ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu.....	64
3.5.2.8 Geri Bağlanma Deneyleri.....	64
3.5.2.9 Seçicilik Deneyleri	65
3.5.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri	66
3.5.3.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi	66
3.5.3.2 Sol-jel Senteziyle Üretilen Sorbentin Karakterizasyonu.....	67
3.5.3.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için MIP/NIP Sentezi	68
3.5.3.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Organik Bazlı MIP/NIP Sentezi	68
3.5.3.5 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sentezlenen Organik Bazlı MIP/NIP'lerin Karakterizasyonu.....	70
3.5.3.6 Geri Bağlanma Deneyleri.....	70
3.5.3.7 Seçicilik Deneyleri	71
3.5.3.8 Elementel Analiz.....	72
3.5.3.9 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için İnorganik Bazlı MIIP/NIIP	73
3.5.3.10 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sentezlenen MIIP/NIIP Karakterizasyonu ...	73



3.5.3.11 Geri Bağlanma Deneyleri.....	73
3.5.3.12 Seçicilik Deneyleri	74
3.6 Kapiler Kolon Kaplama ve Karakterizasyonu	75
3.6.1 Sol-jel Yöntemiyle Kapiler Kolon Kaplama	75
3.6.2 Moleküler Baskılama ile Kapiler Kolon Kaplama	75
BÖLÜM 4	83
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	83
REFERANSLAR.....	87



TABLolar

Tablo 1. Kapiler elektrokromatografide durağan fazlar	4
Tablo 2. Ana ve ilgili tiazidlerin (CT, BFT, HCT) pKa, log Kow değerleri ve kimyasal yapıları	10
Tablo 3. Anti-kanser ilaç etken maddeleri için HPLC-DAD çalışma parametreleri.....	15
Tablo 4. Anti-kanser ilaç etken maddeleri için CE çalışma parametreleri.....	16
Tablo 5. Ağrı kesici ilaç etken maddeleri için CE çalışma parametreleri	17
Tablo 6. Diüretik ilaç etken maddeleri için HPLC-DAD çalışma parametreleri.....	18
Tablo 7. Diüretik ilaç etken maddeleri için CE çalışma parametreleri.....	18
Tablo 8. β -bloker ilaç etken maddeleri için HPLC-DAD çalışma parametreleri.....	19
Tablo 9. β -bloker ilaç etken maddeleri için CE-DAD çalışma parametreleri	20
Tablo 10. Katı faz ekstraksiyon çalışma parametreleri.....	24
Tablo 11. Partikül boyutu kontrol deneyi parametreleri	25
Tablo 12. Silika modifikasyonu için sentez parametreleri.....	27
Tablo 13. Sorpsiyon performans deneylerinde kullanılan parametreler.....	28
Tablo 14. Geri bağlanma çalışmalarında kullanılan parametreler	31
Tablo 15. Seçicilik çalışmalarında kullanılan parametreler.....	31
Tablo 16. Silikat nanopartikülleri ile sorpsiyon çalışmalarında kullanılan parametreler	32
Tablo 17. β -blokerler için geri bağlanma deneylerinde kullanılan çalışma parametreleri.....	35
Tablo 18. β -blokerler için seçicilik deneylerinde kullanılan çalışma parametreleri	35
Tablo 19. Silikat ve fonksiyonlaştırılmış silikat ile yeni kolon sentezi.....	37
Tablo 21. β -bloker ilaç etken maddeleri için CE-DAD çalışma koşulları.....	45
Tablo 22. Metoprolol için MIP/NIP sentez parametreleri	68
Tablo 23. MIP200/NIP200 için elementel analiz sonuçları	72



ŞEKİLLER

Şekil 1. Elektroosmotik akış varlığında yüzey-çözelti arayüzünde oluşan elektrik çift tabaka .	2
Şekil 2. Silika ve/veya modifiye silika dolgulu kapiler kolonda elektroosmotik akış oluşumu ..	2
Şekil 3. (a, c) HPLC ve (b, d) CE/CEC için akış profilleri ve temsili pikler.....	3
Şekil 4. CEC'de kapiler kolon tipleri: (a) açık tüpümsü, (b) dolgulu, (c) yekpare.....	4
Şekil 5. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi	5
Şekil 6. Moleküler baskılama metodunun şematik gösterimi	6
Şekil 7. Farklı işleme seçenekleriyle sol-jel yönteminin şematik gösterimi	6
Şekil 8. Asit ve baz katalizli sol-jel proseslerinin şematik gösterimi	7
Şekil 9. Tayini amaçlanan anti-kanser ilaç etken maddeleri	8
Şekil 10. Tayini amaçlanan β -bloker ilaç etken maddeleri.....	11
Şekil 11. Monomer olarak akrilamid kullanımıyla 5-FU baskılanmış polimer sentezi.....	21
Şekil 12. Monomer olarak metakrilik asit kullanımıyla 5-FU baskılanmış polimer sentezi.....	22
Şekil 13. Baz katalizör ve TEOS kullanımıyla silika sol jel sentezi	25
Şekil 14. 3-APTES ve TEPS ile modifiye edilmiş silikat yüzeyi	26
Şekil 15. Sıcak sentez reaksiyonunda kullanılan sistem	27
Şekil 16. MIP sentezinin ve şablon molekülün ayrılma-geri bağlanma şeması.....	29
Şekil 17. MIIP sentezinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 18. Baz katalizör ve TEOS kullanımıyla silika sol-jel sentezi	32
Şekil 19. Metoprolol için izlenen MIP sentez mekanizması	33
Şekil 20. Metoprolol için sentezlenen MIIP şeması	34
Şekil 21. 10.0 mg/L 5-FU'ya ait kromatogram (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 10:90 asetonitril:su (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm)	39
Şekil 22. 5-FU için kalibrasyon grafiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 10:90 asetonitril:su (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).....	40
Şekil 23. 5-florourasil ve 5-azasitidin karışımının 10.0 mM borat tamponundaki	40
Şekil 24. 5-florourasil ve 5-azasitidin karışımının CE-DAD kalibrasyon grafiği (Agilent 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, borat tampon derişimi: 10.0 mM, analit derişimi: 20.0 mg/L, pH: 11.5, dalgaboyu: 234 nm, voltaj: 20 kV) ..	41
Şekil 25. Diklofenak için kalibrasyon grafiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD Supelco C18, (250 mm x 4.6 mm), 85:15 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 280 nm, n=1).....	41
Şekil 26. Ketoprofen, naproksen ve diklofenak için elektroferogram (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, borat tampon	

derişimi: 10.0 mM, analit derişimi: 20.0 mg/L, pH: 9.0, dalgaboyu: 280 nm, tarama hızı: 2.0 Hz, enjeksiyon süresi: 5.0 s, voltaj: 20 kV).....	42
Şekil 27. (a, d) BFT, (b, e) HCT ve (c, f) CT'ye ait kromatogramlar (Agilent 1200 Serisi HPLC-DAD sistemi, Supelco C18 kolon (Lichrosphere RP 18-5, 25 cm × 4.6 mm), (a, b, c) 80:20 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) mobil faz, (d, e, f) 80:20 metanol: su (fosfat tamponu, pH 6.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı)	43
Şekil 28. (a) 25.0 mM borat tamponu (b) 10.0 mM borat tamponu kullanılarak ayırımı sağlanan analitlerin elektroferogramı	44
Şekil 29. Bendroflumetiazid, hidroklorotiazid ve klorotiazid için CE-DAD kalibrasyon grafiği.	44
Şekil 30. Metoprolol, ketoprofen ve ibuprofen için kalibrasyon grafiği. (Agilent 1200 Series HPLC-DAD system, Supelco C18 kolon (Lichrosphere RP 18-5, 25 cm × 4.6mm), 85:15 MeOH:H ₂ O (pH 3.0) mobil faz, 0.9 mL/min akış hızı, 220 nm)	45
Şekil 31. (a) Metoprolol ve (b) atenolölün pH 9.5'de elde edilen elektroferogramı, (c) atenolol ve metoprolol karışımının 25.0 mM pH 9.5 borat tamponu içinde elde edilen elektroferogramı, (d) atenolol ve metoprolol karışımının 10.0 mM pH 9.5 borat tamponu içinde elde edilen elektroferogramı (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, analit derişimi: 20.0 mg/L, dalga boyu: 225 nm)	47
Şekil 32. Metoprolol için kalibrasyon grafiği. Agilent 7100 series CE-DAD sistemi, Agilent Technologies, FS, (75 µm id, 57 cm kapiler uzunluğu, 50 cm efektif uzunluk), 25.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 220 nm)	47
Şekil 33. NIP/MIP monolitlerinin SEM görüntüleri. (a) NIP (1:1:20 AA), (b) MIP (1:1:20 AA) (c) NIP (1:4:20 AA), (d) MIP (1:4:20 AA), (e) NIP (1:8:20 AA), (f) MIP (1:8:20 AA), (g) NIP (1:8:10 AA), (h) MIP (1:8:10 AA).....	48
Şekil 34. NIP/MIP monolitlerinin SEM görüntüleri. (a) NIP (1:8:20 MAA), (b) MIP (1:8:20 MAA), (c) MIP (1:8:10 AA, (20:20 v/v)), (d) MIP (1:8:10 AA (20:180 v/v))	49
Şekil 35. MIP/NIP monolitlerinin (1:1:20 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	50
Şekil 36. MIP/NIP monolitlerinin (1:4:20 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	50
Şekil 37. MIP/NIP monolitlerinin (1:8:20 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	51

Şekil 38. MIP/NIP monolitlerinin (1:8:10 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	51
Şekil 39. MIP/NIP monolitlerinin (1:8:20 MAA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	52
Şekil 40. MIP/NIP monoliti için seçicilik deneyi (1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 kolonu (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 saf su:asetonitril mobil faz 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	53
Şekil 41. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).....	54
Şekil 42. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:4:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).....	54
Şekil 43. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:8:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).....	55
Şekil 44. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:8:10 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).....	55
Şekil 45. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:8:20 MAA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).....	56
Şekil 46. Sorbent miktarının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP, 1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	56
Şekil 47. Çalkalama süresinin 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP, 1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)	57
Şekil 48. TEOS hacmindeki değişimin ortalama silika partikül boyutuna etkisi.....	58
Şekil 49. EtOH hacmindeki değişimin ortalama silika partikül boyutuna etkisi.....	58
Şekil 50. Silika sol-jel SEM görüntüsü (1 No'lu deney, Tablo 11).....	59
Şekil 51. Sentez prosedüründe farklı EtOH hacimleri ile elde edilen silikatların (Tablo 11) SEM görüntüleri. (a) 15 mL EtOH, (b) 25 mL EtOH, (c) 45 mL EtOH, (d) 55 mL EtOH (İç şekiller partikül boyut dağılımını göstermektedir.)	59

Şekil 52. Amin fonksiyonel grubu ile modifiye edilmiş silikatların SEM görüntüleri	60
Şekil 53. Amin fonksiyonel grubu ile modifiye edilmiş silikatların EDX sonuçları	60
Şekil 54. (a) BFT, (b) HCT, (c) CT için amin ile modifiye edilmiş, fenil ile modifiye edilmiş, hem amin hem fenil ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş silika sol-jel partiküllerinin sorpsiyon kapasiteleri	61
Şekil 55. MIP ve NIP'lerin SEM görüntüleri.....	62
Şekil 56. BFT'nin MIP sorbentinden çıkarılmadan önceki ve sonraki elektroferogramı.....	62
Şekil 57. MIIP ve NIIP'lerin SEM görüntüleri.....	63
Şekil 58. BFT'nin MIIP sorbentinden çıkarılmadan önceki ve sonraki elektroferogramı.....	63
Şekil 59. MIP ve NIP'nin sorpsiyon kapasitesi	64
Şekil 60. MIIP ve NIIP'nin sorpsiyon kapasitesi	65
Şekil 61. Yapısal olarak benzer bileşiklerin varlığında MIP ve NIP'nin sorpsiyon kapasitesi ..66	
Şekil 62. Yapısal olarak benzer bileşiklerin varlığında MIIP/NIIP'nin sorpsiyon kapasitesi66	
Şekil 63. Sol-jel yöntemiyle sentezlenen silika partiküllerinin SEM görüntüsü	67
Şekil 64. Silika partiküllerinin sorpsiyon grafiği	67
Şekil 65. Metoprolol şablonlu MIP'lerin yıkama öncesi ve sonrası elektroferogramı (Agilent 7100 series CE-DAD sistemi, Agilent Technologies, FS, (75 µm id, 57 cm kapiler uzunluğu, 50 cm efektif uzunluk), 25.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 220 nm)	69
Şekil 66. (a) MIP200, (b) NIP200, (c) MIP50 ve (d) NIP50'nin SEM görüntüleri	70
Şekil 67. (a) MIP200 ve NIP200'ün, (b) MIP50 ve NIP50'nin sorpsiyon grafikleri	71
Şekil 68. MIP200'ün ketoprofen ve ibuprofen varlığında metoprolole seçiciliği	72
Şekil 69. (a) MIIP, (b) NIIP'nin SEM görüntüleri	73
Şekil 70. Metoprolol için geri bağlanma deneyi	74
Şekil 71. MIIP'nin ketoprofen ve ibuprofen varlığında metoprolole seçiciliği.....	74
Şekil 72. Modifiye edilmemiş silika ile kaplanan kapiler kolonun SEM görüntüsü.....	75
Şekil 73. Boş kapiler kolonun SEM görüntüsü	76
Şekil 74. MIP ile kaplanmış kapiler kolonun SEM görüntüsü	76
Şekil 75. 50.0 ppm'lik tiazid çözeltisinin elektroferogramı (MIP ile kaplanmış kapiler kolon)..76	
Şekil 76. 100.0 ppm'lik tiazid çözeltisinin elektroferogramı (MIP ile kaplanmış kapiler kolon)77	
Şekil 77. MIP200 ile kaplanan kapiler kolonun kesiti; büyütme (a) 2.500x, (b) 5.000x	77
Şekil 78. MIIP ile kaplanan kapiler kolonun kesiti; büyütme (a) 2.500x, (b) 5.000x	78
Şekil 79. MIP200 ile kaplanan kapiler kolonun kesiti; büyütme (a) 5.000x, (b) 25.000x.....	78
Şekil 80. CE cihazı içerisinde sıcaklık ile hazırlanan kolon kullanılarak elde edilen metoprolol ve atenolola ait elektroferogram. (a) 50.0 mg/L ve (b) 100 mg/L.....	79



Şekil 81. Metoprolol ve atenolol için elde edilen kalibrasyon grafikleri (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent series 75 mm MIP200 ile kaplanmış kolon, borat tampon derişimi: 10.0 mM, analit derişimi: 20.0 mg/L, dalga boyu: 225 nm).	80
Şekil 82. UV ışık kaynağı kullanılarak (fotopolimerizasyon) hazırlanan kolonla elde edilen metoprolol ve atenolole (50.0 mg/L) ait elektroferogram	82
Şekil 83. Kapiler elektroforez cihazı ve ölçüm sistemi.....	82



ÖZET

ÇEŞİTLİ İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFI İLE TAYİNİ İÇİN YENİ KAPİLER KOLONLAR GELİŞTİRİLMESİ

Projenin amacı, üç farklı ilaç etken madde grubundan beta-blokerler (metoprolol ve atenolol), anti-kanser ilaçları (5-florourasil ve azasitidin) ve diüretik ilaçların (bendroflumetiazid, klorotiazid ve hidroklorotiazid), kapiler elektroforez ve kapiler elektrokromatografi ile tayini için yeni metotlar geliştirilmesidir. İlk çalışmada, anti kanser ilaçların etken maddesi olan 5-florourasil ve 5-azasitidin için farklı formülasyonlara (farklı fonksiyonel monomerler, porojenler ve monomer:çapraz bağlayıcı oranları) sahip moleküler baskılanmış polimerler (MIP) sentezlendi. Çözelti pH'sı, çalkalama süresi, sorbent miktarı gibi parametreler optimize edildi ve bu koşullarda 5-FU ve 5AC için dedeksiyon limit (LOD) değerleri sırasıyla 0.40 mg/L ve 0.28 mg/L ve tayin limit (LOQ) değerleri 1.33 mg/L ve 0.92 mg/L olarak hesaplandı. İkinci çalışmada, analit grubu olarak seçilen tiazidlerin belirlenmesinde kullanılacak kapiler elektrokromatografi kolonu hazırlanması için sol-jel kimyası ve moleküler baskılama tekniği kullanıldı. Modifiye silika sol-jeller (amin- ve fenil-modifiye) ve farklı MIP materyalleri (inorganik- ve organik-bazlı) durağan faz kaplama malzemesi olarak kullanılmak için sentezlendi. Kolon içine yüklenecek maddenin seçimi için kapiler elektroforez (CE) öncesinde sorpsiyon çalışması yapıldı. Kritik deneysel parametreler optimize edildi; elektrolit çözeltisi olarak pH'sı 9.4'e ayarlanmış 10.0 mM borat seçildi. Çalışma voltajı 25 kV, kaset sıcaklığı 30.0 °C'ye sabitlendi. LOD değerleri 0.20 mg/L ile 0.30 mg/L, LOQ değerleri 0.44 mg/L ile 0.99 mg/L arasında bulundu. Çalışmanın üçüncü kısmında, β -blokerlerin tayini için moleküler baskılanmış organik-inorganik polimerler ve sol-jel metoduyla silikat nanopartikülleri sentezlendi ve kapiler elektrokromatografi kolonunda kaplama/dolgu malzemesi olarak kullanıldı. Sentezlenen üç farklı sorbentin sorpsiyon performansı kıyaslandı. Moleküler baskılanmış organik polimerlerin metoprolole yüksek sorpsiyon kapasitesi ve seçicilik gösterdiği belirlendi. Durağan faz optimizasyon çalışmalarından sonra CEC kolonu geliştirildi ve analitik performansı incelendi. Söz konusu kolonla yapılan çalışmalarda metoprolol için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 10.0 mg/L ve 32.0 mg/L olarak hesaplandı.

Anahtar kelimeler: Kapiler Elektrokromatografi, Kapiler Elektroforez, MIP



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NOVEL CAPILLARY COLUMNS FOR THE DETERMINATION OF VARIOUS DRUGS BY CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

Purpose of this project is to develop new methods for capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic determination of active ingredients of three different groups of drugs, namely, anti-cancer drugs (5-fluorouracil and 5-azacytidine), diuretics (bendroflumethiazide, chlorothiazide hydrochlorothiazide) and beta-blockers (metoprolol and atenolol). In the first study, molecularly imprinted polymers (MIP) having different formulations (different functional monomers, porogens, and monomer:crosslinker ratios) were synthesized for 5-fluorouracil and 5-azacytidine, the active ingredients of anti cancer drugs. Experimental parameters such as solution pH, shaking time and amount of sorbent were optimized, and limit of detection (LOD) values as 0.40 mg/L and 0.28 mg/L, and limit of quantification (LOQ) values as 1.33 mg/L and 0.92 mg/L were calculated for 5-FU and 5AC, respectively. In the second study, sol-gel chemistry and molecularly imprinted polymers were used to prepare capillary column for electrochromatography to be used for the determination of thiazides. Modified silica sol-gels (amine- and phenyl-modified) and different MIP materials (organic- and inorganic-based) were synthesized to be used as stationary phase coating material. Materials to be coated into the column were selected by the help of sorption studies prior to CE studies. For this purpose, critical experimental parameters for CE were optimized; borate buffer (10.0 mM) with a pH of 9.4 was used as the background electrolyte. Working voltage of 25 kV and cassette temperature of 30.0 °C were applied. LOD and LOQ values were found to be between 0.20 mg/L and 0.30 mg/L, and 0.44 mg/L and 0.99 mg/L, respectively. In the third part of the study, molecularly imprinted organic-inorganic polymers and silicate nanoparticles were synthesized for the determination of β -blockers and used as the coating/filling material for the capillary electrochromatography column. Sorption performance of the three types of sorbents synthesized was compared and molecularly imprinted organic polymers have shown to have higher sorption and selectivity towards metoprolol. LOD and LOQ were calculated as 10.0 mg/L and 30.0 mg/L, respectively, for metoprolol with the capillary column prepared.

Keywords: Capillary Electrochromatography, Capillary Electrophoresis, MIP

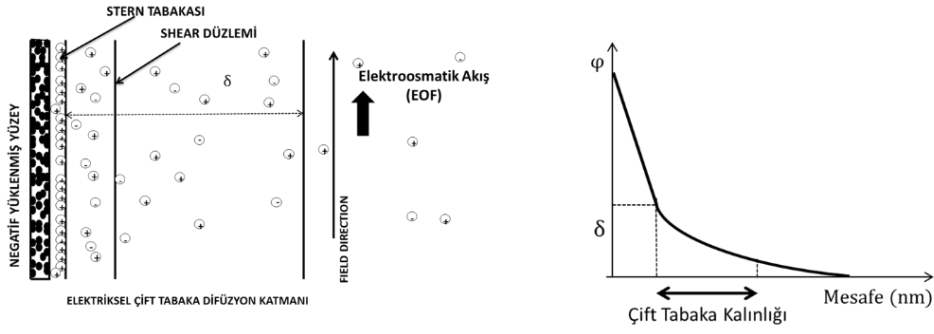


BÖLÜM 1

GİRİŞ

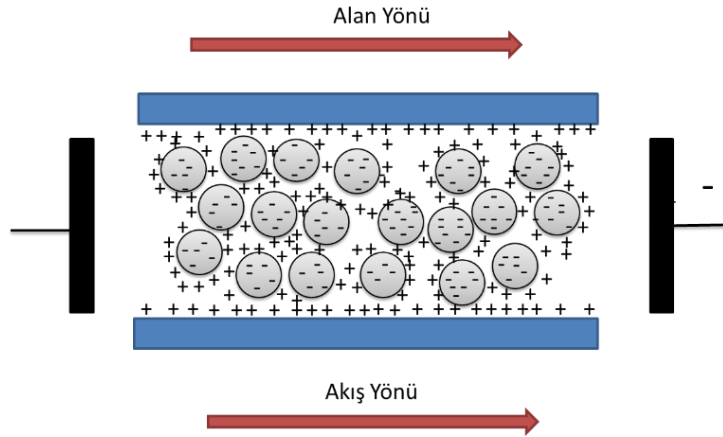
1.1 Kapiler Elektrokroforez ve Kapiler Elektrokromatografi

Kapiler elektroforez (CE) ve kapiler elektrokromatografi (CEC), aynı cihazı kullanmakla birlikte ayırma prensipleri birbirinden farklı, nispeten yeni iki tekniktir. Kapiler elektroforez, bir kapiler tüp içindeki çözeltiye doğru akım uygulandığında, çözeltideki analitlerin farklı hızlarla göç etmesi ve uygun bir detektör ile tayin edilmesi esasına dayanır. Analitlerin gittiği yöndeki kapiler borunun sonuna uygun bir detektör konular ve analitler sırayla tayin edilir. Elektroforetik akışta katyonlar katoda, anyonlar anoda yönelirken nötral maddeler hareket etmez. Göç hızı, ayrılan maddenin yüküne ve kütesine bağlıdır; yük/kütle oranı büyük olanlar daha hızlı göç eder. Elektroosmotik akış varlığında ise tüm maddeler aynı yöne doğru hareket eder. Bunun sebebi, (genellikle) silikadan mamul kapiler borunun iç yüzeyinde, silika ile çözelti ara yüzünde oluşan elektrik çift tabakasıdır. Çözelti pH'sı yüksek iken silika yüzeyindeki asidik silanol (Si-OH) grupları ayrışır ve yüzey negatif yüklenir (Şekil 1) (Bartle vd. 2001). Yüzeyde oluşan negatif yükü dengelemek için çözeltideki katyonlar yüzeye yaklaşır ve bir katyon tabakası oluşturur. Böylece, silika yüzeyi ile ana çözelti (yığın, bulk) arasında bir "elektrik çift tabaka" oluşur. Burada oluşan potansiyel farkı "zeta potansiyel" olarak adlandırılır. Kapiler boruya voltaj uygulandığında elektrik çift tabakadaki katyonlar katoda doğru hareketlenir ve "solvated" olduklarından, etraflarındaki yığın çözeltiyi de kendileriyle birlikte sürükler. Buna "elektroosmotik akış (electroosmotic flow, EOF)" denir. Kapiler elektroforezde ayırma becerisi EOF'ye, EOF ve zeta potansiyel ise çözelti pH'sına bağlıdır. Bu nedenle CE'de pH kontrolü çok önemlidir. CE'de ayırmayı etkileyen en önemli parametreler uygulanan voltaj, tampon çözelti pH'sı, iyonik kuvvet ve tamponu oluşturan maddelerin derişimi, sıcaklık, organik matriks değiştirici varlığı, yüzey aktif madde varlığı gibi parametrelerdir. Elektroosmotik akış ise yüzeydeki yükün yoğunluğuna, elektrik alanının gücüne, elektriksel çift tabakanın kalınlığına ve kullanılan çözeltinin viskositesine bağlıdır. Viskositenin de sıcaklığa bağlı olduğu hatırlanmalıdır (Bartle vd. 2001).



Şekil 1. Elektroosmotik akış varlığında yüzey-çözelti arayüzünde oluşan elektrik çift tabaka

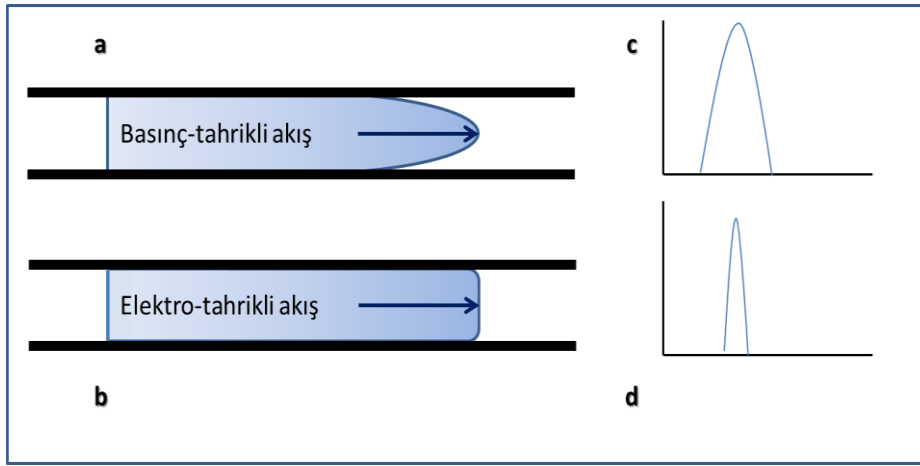
Kapiler elektrokromatografi (CEC), kapiler elektroforez (CE) ve yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC)'nin bileşimi gibi düşünülebilir. Kromatografide en yaygın kullanılan durgun fazlardan biri silikadır. Farklı amaçlarla çok sayıda durgun faz destek maddesi geliştirilmiştir ve çeşitli numunelerin analizinde kullanılmaktadır. Kapiler kolondaki elektroosmotik akışı açıklamak için ters faz silika partiküllerinden yararlanılabilir. Silika boruda olduğu gibi silika partiküllerinin yüzeyinde de silanol grupları vardır; bu gruplar yukarıda açıklandığı şekilde elektroosmotik akış üretirler (Şekil 2).



Şekil 2. Silika ve/veya modifiye silika dolgu kapiler kolonda elektroosmotik akış oluşumu

Kapiler elektrokromatografi, temel kromatografik teori ve kapiler elektroforetik metodolojiye dayanan karma bir yöntemdir. Analitlerin ayrışması, elektroforetik hareketlilik ve analitlerin mobil faz ile durağan faz arasındaki etkileşimiyle veya bunlardan sadece biri ile elde edilir. CEC modunda, elektrik kuvveti CE modunda olduğu gibi uygulanır, ancak bu sırada kılcal kolonun içinde durağan bir faz da vardır. Teknik, CE'ye benzemektedir, bu nedenle CE cihazına sadece birkaç ekleme (harici basınç sistemi ve özel dolgu kılcal kolon), CEC tayinlerini mümkün kılar. Parabolik akış şekline sahip HPLC'nin aksine, CE ve CEC'deki elektroosmotik akış yassı bir şekle sahiptir. Bu levha yüksekliğini azaltır ve HPLC ile

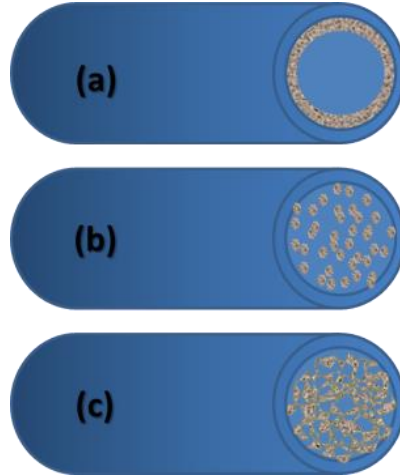
karşılaştırıldığında ayırma verimliliğini artırır (Şekil 3). Kolon uzunluğunun artırılması, basıncın artmasına ve ayrıca HPLC'deki analiz hızının azalmasına neden olur. Bununla birlikte, CEC tekniğinde kullanılan elektro-tahrikli kuvvet sayesinde kolon uzunluğundan etkilenilmez, gerektiğinde daha uzun kolonlar kullanılabilir. Kolondaki dolgu malzemesinin (parçacıkların) çapı ise basınçla çalışan akışta önemlidir. Çünkü parçacıkların arasından akan çözeltinin profili değişken parçacık boyutları nedeniyle bölge genişlemesine uğrayarak analizin kalitesini düşürür. Elektro-tahrikli durumda sağlanan düz şekilli akış profili, kromatogramdaki bölge genişlemesini ve kolondaki geri basıncı önlemektedir (Smith 1999, Agilent Technologies 2014, Jiskra 2002, Eeltink vd. 2003).



Şekil 3. (a, c) HPLC ve (b, d) CE/CEC için akış profilleri ve temsili pikler

1.1.1 Kapiler Elektrokromatografide Durağan Fazlar

Kapiler elektrokromatografide kolon geliştirme çalışmaları, ticari HPLC kolonlarının durağan fazlarının bu yöntemle entegre edilmesiyle başlamıştır. Bu durumda, sabit fazlar uygulanan arka plan elektroliti altında dayanıklı ve kuvvetli EOF oluşturmak için etkisizdi. Bu nedenle, gerekli EOF oluşturma yolunda birçok yöntem geliştirilmiştir. Morfolojik açıdan bakıldığında, açık tübümsü, yekpare ve dolgulu olmak üzere üç tip kolon vardır (Şekil 4).



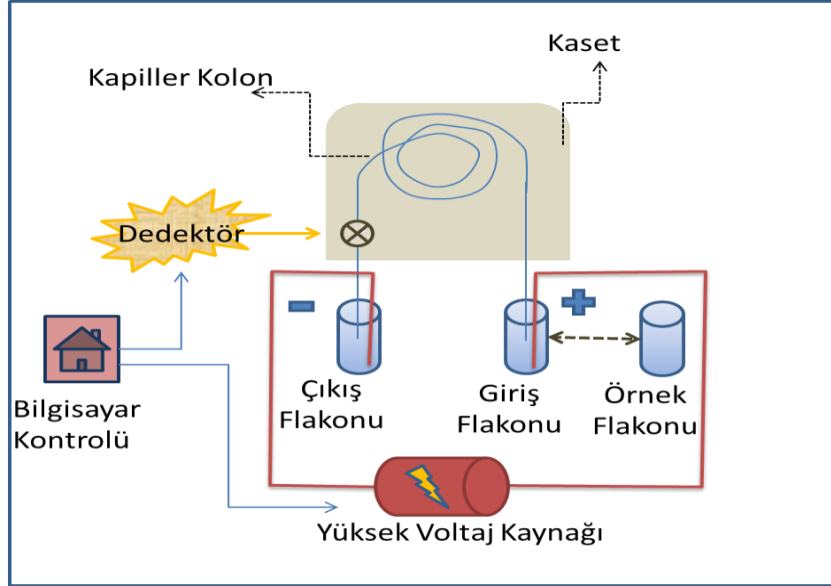
Şekil 4. CEC'de kapiler kolon tipleri: (a) açık tüpümsü, (b) dolgulu, (c) yekpare

Durağan fazların hazırlanmasında kullanılan malzemeler iki ana kategoriye ayrılır; polimer bazlı (organik) ve silika bazlı (inorganik) durağan fazlar (Tablo 1). Durağan fazın hazırlanması, doğru bir analiz için iyi organize edilmiş bir prosedür gerektirir; sentez sırasında hem yüzey kimyası hem de gözenek oluşumu dikkate alınmalıdır. Literatürde farklı amaçlar için birçok dolgu tipi bildirilmiştir; kiral ayırma, iyon değişimi, hidrofilik veya hidrofobik ayırma, ligand seçici fazlar, normal veya ters fazlar, vb. (Jiskra 2002; Cheong vd., 2013; Bartle 2000; Tarongoy vd., 2016; Ganzera 2010; Eeltink vd., 2006; Eeltink vd., 2003).

Tablo 1. Kapiler elektrokromatografide durağan fazlar

İnorganik (Silika Bazlı) Durağan Fazlar	Organik (Polimer Bazlı) Durağan Fazlar
EOF arttırıcı fazlar	Akrilamid jeller
Konvansiyonel fazlar	PEEK bazlı fazlar
Özel amaçlı fazlar	Polimetakrilat fazlar
Yüklü gruplar	Selüloz bazlı fazlar

Basit bir CE sistemi; örnek (analit) içeren flakon, arkaplan elektroliti (tampon çözelti) içeren giriş-çıkış flakonları, analize uygun bir kapiler kolon ve bunu muafaza edecek bir kaset, analize yönelik seçilmiş bir dedektör (UV-Vis, DAD, Lazer Kaynaklı Floresans, Temassız İletkenlik Dedektörü, vb.), yüksek voltaj kaynağı ve bilgisayarlı yönetim sistemini içermektedir (Şekil 5) (Agilent Technologies, 2014).



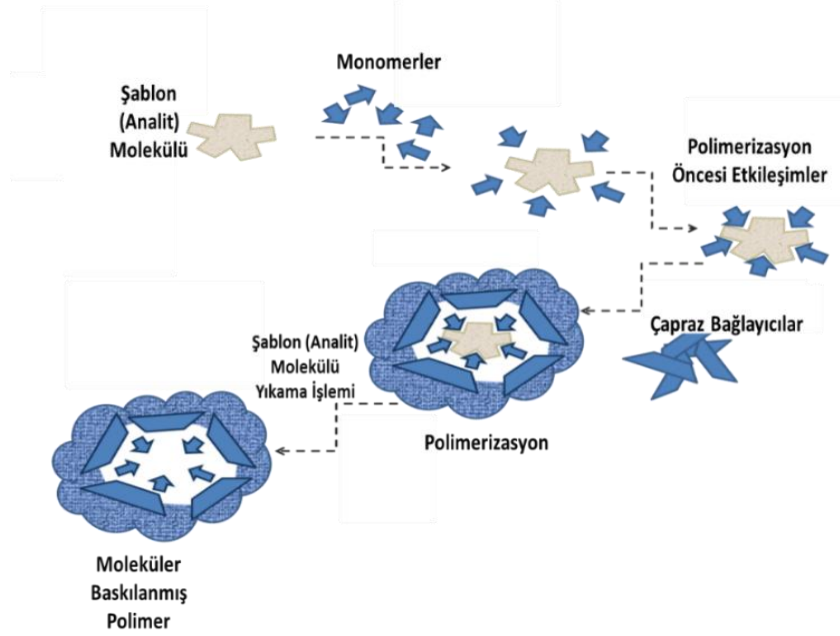
Şekil 5. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi

1.2 Önerilen Kaplama Malzemeleri

1.2.1 Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

Moleküler baskılanmış polimer metodolojisi, analit sorpsiyonu ve tayini için moleküler bazda oldukça spesifik materyaller tasarlanmanın cazip bir yoludur. Düşük üretim maliyeti, sağlam mekanik özellikler, kimyasal kararlılık, seçicilik ve biyoyumluluk gibi birçok avantaj, bu teknolojiyi son derece elverişli kılmaktadır. Moleküler baskı teknolojisinin inorganik veya organik dallarının uygulamaları; kromatografik yöntemlerin durağan fazlarında, antikor-antijen sistemi taklit etmede, katı faz ekstraksiyon sorbentlerinde, ilaç taşıyıcı sistemlerde, sensörlerde ve bunlara benzer oldukça geniş bir alanda kullanılmaktadır (Deng, 2015; Iacob vd., 2014; Junjie vd., 2013; Lv vd., 2012; Mu vd., 2015).

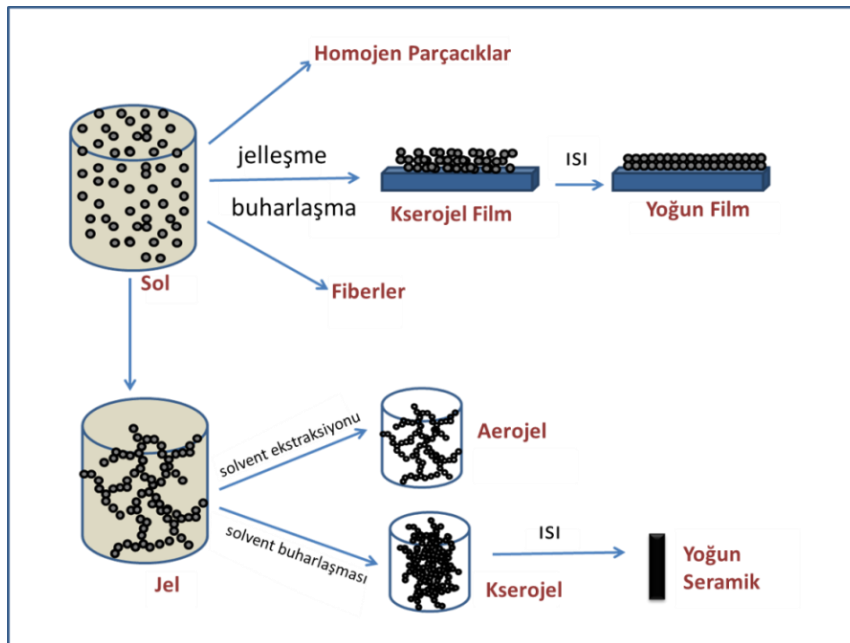
Temel olarak, moleküler baskılama teknolojisi, şablon molekül etrafındaki monomerlerle örülen bir polimer ağı üzerinde çalışır ve yapıyı çapraz bağlayıcılarla güçlendirir. Şablon molekülü ve monomer yarı kovalent veya kovalent olmayan yollarla birbirleriyle etkileşir ve bağlar oluşturulur. Daha sonra bu bağlar kırılarak şablon yapıdan uzaklaştırılır. Ortaya çıkan son yapı, şablon moleküle özgü boşluklara sahiptir. Bu moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler), şablon molekülü ve diğer yapısal olarak benzer moleküllerle etkileşime girme eğilimindedir. Moleküler baskılanmamış polimer (NIP), MIP'nin körü (blank) olarak düşünülebilir; bu durumda şablon molekül kullanılmaz ve diğer tüm adımlar aynen uygulanır. Özel boşluk oluşmadığı için analite karşı seçicilik beklenmez. Adımların şematik temsili Şekil 6'da verilmiştir (Sellergren, 2000; Sarafraz-Yazdi vd., 2015; Olcer vd., 2017).



Şekil 6. Moleküler baskılama metodunun şemantik gösterimi

1.2.2 Silan Kimyası ve Sol-Jel Temelleri

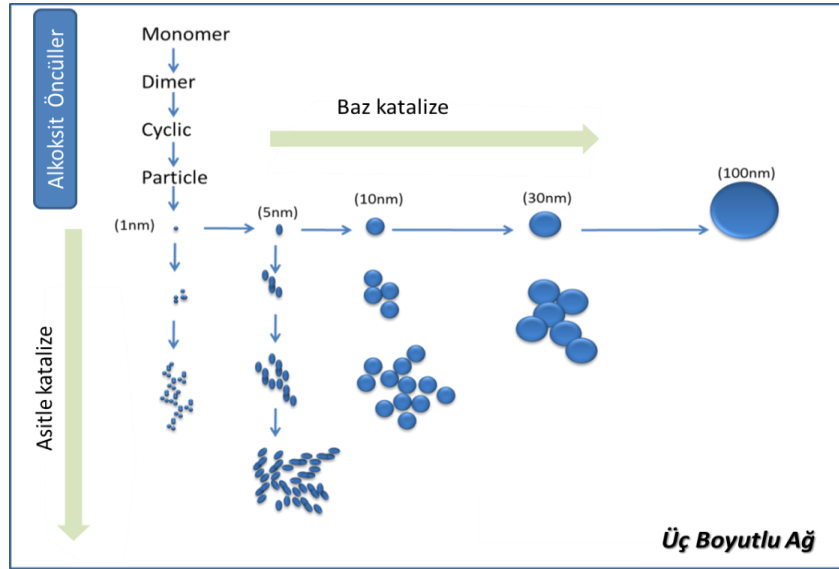
Sol-jel teknolojisi, sol öncüllerin polikondensasyonunun artırılarak sıvı bir fazda üç boyutlu oksit ağı oluşturulmasını içerir. İstenen son biçim, çözücünün Şekil 7’de gösterilen farklı yöntemlerle uzaklaştırılmasıyla oluşur (Schubert vd., 2000).



Şekil 7. Farklı işleme seçenekleriyle sol-jel yönteminin şemantik gösterimi

Sol-jel yöntemi hem inorganik hem de organik-inorganik hibrit polimerlerin elde edilmesi için önemli bir tekniktir. Tekniğin ana avantajı, tüm sürecin nispeten ılımlı şartlarda gerçekleştirilmesidir. Katı hal işlemlerinden farklı olarak sol-jel tekniği, öncül türlerin son ürüne geçişi sırasında reaksiyonun moleküler seviyede kontrol edilmesine izin verir. Bu nedenle, homojen kristal yapıda ve iyi tanımlanmış nanoparçacıkların sentezlenmesi sağlanabilir (Schubert vd., 2000; Hench vd., 1990; Danks vd., 2016).

İlk olarak, saf başlangıç malzemelerinin homojen çözeltileri hazırlanır. Daha sonra alkoksit çözeltilisine su ilave edilerek hidroliz gerçekleştirilir. Reaksiyon, hidrolize monomerlerin polikondensasyonunu sağlamak için bazik veya asidik koşullarda katalize edilir. Asitle katalize edilen mekanizmada, doğrusal veya rastgele dallanmış bir polimer oluşur. Eşit derişimde katalizörler kullanıldığında, baz katalizli reaksiyonlar asit katalizli reaksiyonlardan daha yavaştır. Ayrıca, ürünün yapısı daha yoğun ve sıkıdır (Şekil 8). Sol-jel yapısı, peptitleşmenin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Hidroliz ve kondensasyon reaksiyonları, jel oluşana kadar solü viskoz hale getirir. Jel, sıvı içinde bulunan gözenekli bir üç boyutlu ağ olarak düşünülebilir. Sol-jel, bu ağ ile birlikte alkol ve su gibi yan maddeleri içerir. Hedeflenen yapıya bağlı olarak suyu, organik çözücülerini vb. gidermek için ısı işlemi uygulanabilir.



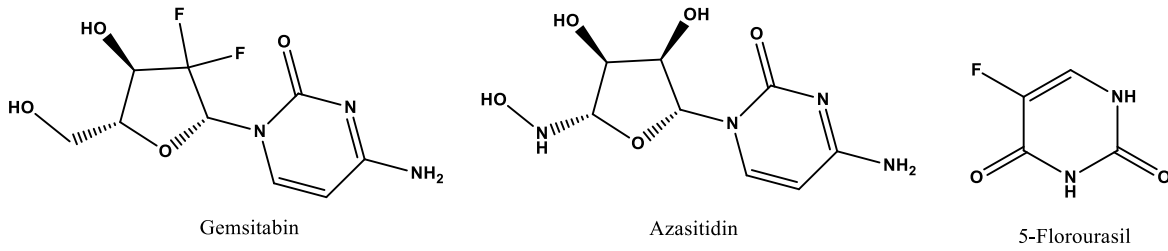
Şekil 8. Asit ve baz katalizli sol-jel proseslerinin şematik gösterimi

1.3 Hedef Analit Grupları

1.3.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri

Günümüzde kanser hastalığı giderek artmaktadır. Kanserli hücre kontrolsüz olarak bölünüp sürekli çoğalır ve kendine yeni DNA sentezler. Bir grup anti-kanser ilaçlarındaki amaç, vücutta

DNA sentezi yapan enzimleri durdurarak yeni DNA sentezini inhibe etmek ve böylece kanser hücrelerinin büyümesini engellemektir. Farklı kanserler için çeşitli anti-kanser ilaç etken maddeleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında 5-florourasil, gemsitabin, azasitidin de vardır (Şekil 9). ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (NCI) göre 5-florourasil timidilat sentaz enzimini durdurarak DNA sentezini inhibe eder. Gemsitabin ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe edip DNA sentezini durdurur. Azasitidin ise DNA metiltransferaz enzimini inhibe ederek DNA metilasyonunu durdurur.



Şekil 9. Tayini amaçlanan anti-kanser ilaç etken maddeleri

5-florourasil (5-FU), sindirim sistemi, karaciğer, beyin, meme, kolorektal, mide, kolon vb. birçok kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan anti-kanser ilaç etken maddesidir. Etkisini çok hızlı gösteren madde, yüksek derişimlerde toksik etkiye sahiptir (Çetin vd. 2015). Bu nedenle kandaki seviyesinin tayini önemli hale gelir. Procházkova vd. (2001) kapiler elektroforezin duyarlılığından yararlanarak kanserli pankreas hücrelerinde 5-FU ve metabolitlerini ayırabileceklerini göstermiş, aynı analizin plasmada, hücre ortamında ve pankreas dokusunda da yapılabileceğini belirtmiştir. Sun vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada, afinite kapiler elektroforez (ACE) yöntemini kullanarak uygun pH'da 5-FU ile insan serum albumin (HSA) arasındaki etkileşimden bahsetmiştir. Araştırmacılar, pH 7.4'de 67 mM fosfat tampon çözeltisi, 15 kV voltaj ve 293 K sıcaklık uygulandığında en iyi ayrımı gözlemiş, 5-FU'nun migrasyon zamanının HSA'nın derişimiyle arttığını belirtmiştir. Derazshamshir vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, 5-FU'nun dağıtımı için baskılanmış kriojel diskler hazırlanmıştır.

Gemsitabin pankreas, akciğer, tekrar eden yumurtalık ve metastas olmuş meme kanseri gibi birçok kanser türünün tedavisinde ve genellikle katı tümörler üzerinde kullanılmaktadır (Florea vd., 2015). Renault vd. (2015) gemsitabin tayininde, monomeri ve daha sonra altın bağlanmış monomer ile gemsitabini elektropolimerizasyon tekniği ile altın elektrot üzerine tutturarak moleküler baskılanmış polimer oluşturmuş ve ekstraksiyon ile gemsitabini alıp tekrar bağlamayı başarmıştır. Schäfer vd. (2010) gemsitabinin DNA metilasyonu üzerindeki etkisinden bahsetmiştir.

Azasitidin pirimidin nükleositidir ve anti-kanser ilacı olarak akut ilik kanseri ve miyelodisplastik sendromunun tedavisinde kullanılır (Tunç vd., 2013). Şu ana kadar yapılan klinik çalışmalar azasitidininin dozunun tolere edilebilir maksimum seviyenin yaklaşık on kat altında olduğunu göstermiştir. Bu düşük dozun ilacın toksik etkisini azalttığına ve DNA demetilasyonunu arttırdığına inanılmaktadır (Brueckner vd., 2010). Anılan çalışma, azasitidininin yağ asitleri ile esterlenmesi sonucunda iyileştirici gücünün arttığını göstermektedir. İnsanda kolon ve meme kanseri hücrelerinde esterlenmiş ilaçların demetilasyon aktivitesi de çalışılmıştır.

Anti-kanser ilaç etken maddelerinin çeşitli biyolojik sıvılarda tayini mümkündür. Bunlar arasında kan, kan plasması, idrar, doku, salya ve omurilik sıvısı da vardır (Ali vd., 2013).

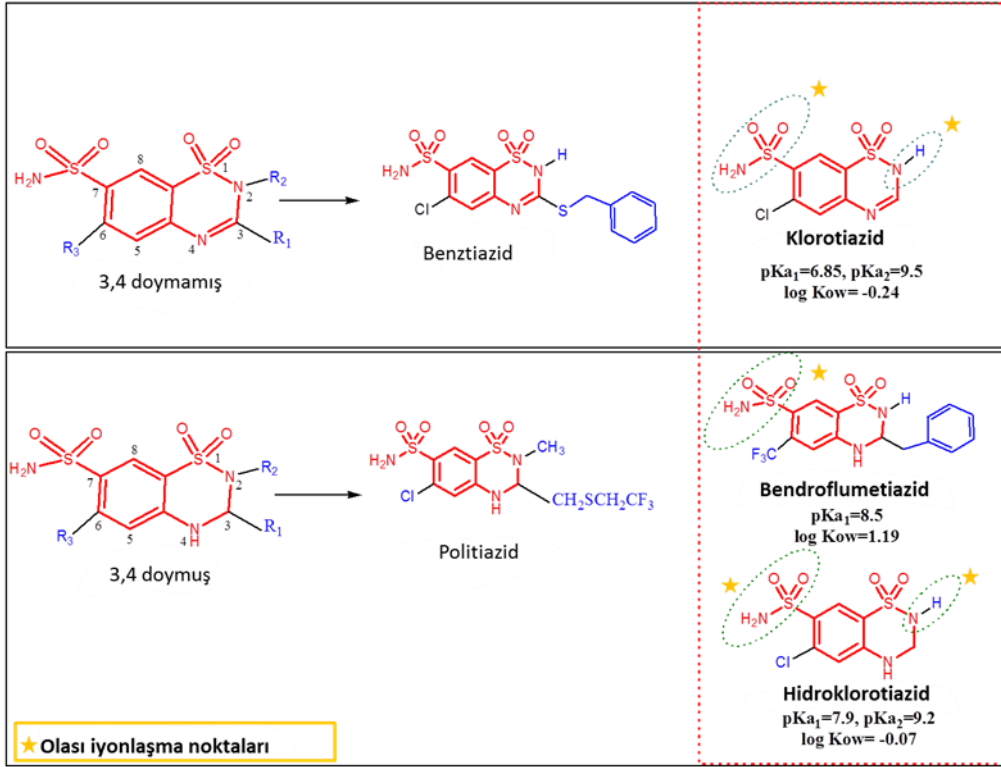
1.3.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri

Diüretikler, renal tübüllerdeki elektrolitlerin (Na^+ , K^+ , H^+ , Cl^- , HCO_3^- vb.) ve suyun geri emilimini kontrol eden önemli terapötik ajanlardır. Tübüllerdeki geri emilimin kontrol edilmesi sürecinin ana sonucu, idrar hacmi ve idrar akış hızının artmasıdır. Bu ilaçlar, nefropatinin tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır ve ayrıca kalp yetmezliği (konjestif kalp yetmezliği, hipertansiyon), siroz, hipoparatiroidizm, ödem ve diyabet insipidus (Hsu vd., 2011; Goebel vd., 2004) gibi çeşitli bozukluklarda da kullanılmaktadır (Barbosa, 1998; Loffing, 2004).

Uluslararası Olimpiyat Komitesi (IOC) ve Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA), bilim adamları ve tıbbi komisyon yardımı ile tüm spor müsabakaları için yasaklı maddelerin listesini yıllardır revize ederek yayınlamaktadır. WADA tarafından en son yayınlanan yasaklı maddeler listesinde (1 Ocak 2018); anabolik ajanlar, büyüme faktörleri, hormon ve metabolik modülatörler, uyarıcılar, hipoksi-indüklenebilir faktör (HIF) aktive edici ajanlar, diüretikler ve maskeleyici ajanlar, β -2 agonistleri gibi on farklı ana sınıf mevcuttur (WADA 2018a). Gerekli minimum performans seviyesi (MRPL) ise WADA tarafından belirlenen ve tüm akredite laboratuvarların rutin test yöntemlerinde ulaşması gereken minimum tespit edilebilen derişimi ifade eder.

Bu bağlamda diüretiklerin yasaklı maddeler arasında yer almasının başlıca sebepleri şöyle belirtilebilir; idrar miktarının artırılması ile kullanılmış diğer doping ajanlarının derişiminini azaltır ve idrar pH'sını değiştirerek yasaklı ilaçların pasif atılım eylemlerinin inhibisyonuna neden olur. Ayrıca, ağırlık sınıflarını içeren herhangi bir müsabakadan önce fazla kilo kaybına sebebiyet vermesiyle kategorisel açıdan haksızlık yaratması nedeniyle doping ajanı olarak da belirtilir. MRPL'leri ise en son WADA raporlarında 200 ng/mL olarak bildirilmiştir (Morra vd., 2006; Goebel vd., 2004; Ventura, 1996; WADA 2018).

Tablo 2. Ana ve ilgili tiazidlerin (CT, BFT, HCT) pKa, log Kow değerleri ve kimyasal yapıları



Diüretiklerin sınıflandırılması için farklı kimyasal özellikleri ve farmakolojik etkileri kullanılır. Asidik diüretiklerin bazıları, loop diüretikler olan furosemid, etakrinik asit ve bumetanidlerdir. Acetazolamid (karbonik anhidraz inhibitörü), triklormetiazid, benzthiazid (tiazidler) ve mannitol (ozmotik diüretik) zayıf asidik özelliğe sahip olan diüretik örnekleridir. Ayrıca tiazid familyasından hidroklorotiazid gibi zayıf bazik özellikteki diüretik örnekleri de vardır. Spironolakton ve kanren gibi nötr diüretikler (spironolaktonun aktif metaboliti) aldosteron antagonistleri olarak adlandırılır, ancak daha genel anlamda potasyum tutucu diüretiklere aittir. Triamteren ve amilorid gibi temel diüretikler potasyum tutucu diüretiklerdir (Barbosa, 1998; Siren vd. 2008; Ventura (1993,1996)).

Bu çalışmada bendroflumetiazid (BFT), klorotiazid (CT) ve hidroklorotiazid (HCT) incelendi. Tablo 2, ilgili yapıların pK_a ve log K_{ow} değerlerini göstermektedir. Ayrıca, bu moleküllerin olası iyonlaşma noktaları, sülfonamid grubunda yer alan ve benzotiadiazin halkasına gömülmüş amin grupları olarak belirtilir.

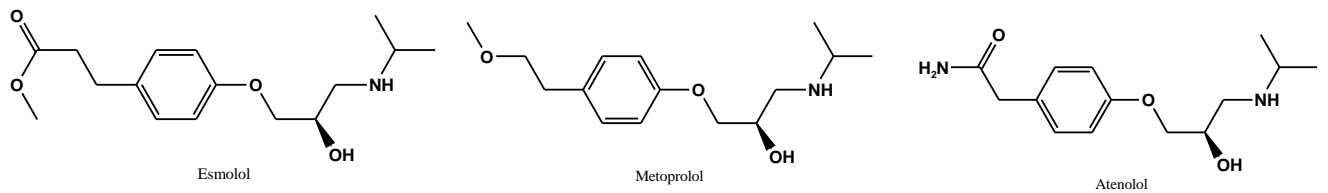
İdrar örneklerinde diüretik maddelerin tanımlanması için literatürde çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Deventer vd. (2009) sıvı kromatografi-elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometre (LC-ESI/MS/MS) öncesi sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirmiş ve idrar örneklerinde althizid, hidroklorotiazid ve metabolitleri gibi doping ajanlarını belirlemiştir. Başka bir çalışmada, Ho vd. (2013), sorbent olarak çok duvarlı karbon nanotüp (I-MWCNT) ile

immobilize edilen içi boş fiber sıvı faz mikro ekstraksiyon liflerini (HF-LPME) kullanmıştır. Ekstrakte edilen örneklerde diüretik maddelerin tayini için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) kullanılarak analiz gerçekleştirilmiş ve tespit limitleri 0.09 ile 0.51 ng/mL (RSD<%5,7) olarak belirlenmiştir. Schappler vd. (2008), kütle spektrometre ile birleştirilmiş kapiler elektroforez ve mikroemülsiyon elektrokinetik kromatografi metodunu kullanarak asidik, nötr ve bazik diüretik maddeleri saptamıştır. Daha sonra ise bu iki metodun duyarlılık, seçicilik ve verimlilik açısından tarama modlarını karşılaştırmıştır. Nispeten daha eski bir çalışmada, Luis ve ark. (2002), hidroklorotiazid, furosemid, triamteren ve klortalidon içeren ilaç karışımını analiz etmek için kapiler bölge elektroforez (CZE) modunu ve misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) yöntemini kullanmışlardır. CZE'nin, yüklü ve nötr analitleri ayırmada, MEKC yöntemine göre daha az etkili olduğunu belirtmişlerdir. Buna ek olarak, tespit limiti hidroklorotiazid için 0.85 µg/mL olarak belirtilmiştir.

1.3.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri

β -blokerler, hastalarda hastalık ve ölüm oranını azaltmak için yaygın olarak kullanılan kardiyovasküler ilaçların etken maddeleridir. Miyokardiyal enfarktüs, anjina, hipertansiyon, kardiyak aritmi gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda kullanılmasının yanı sıra anksiyete ve migrenin kontrolünde de rol almaktadır.

β -adrenoseptörler sinir sistemi ile kardiyovasküler sistemi birbirine bağlamaktadır. Farklı dokularda olmak üzere 3 tip β -adrenoseptör vardır. β_1 adrenoseptörler çoğunlukla kalpte, β_2 reseptörleri genellikle düz kalp kaslarında, β_3 reseptörleri ise yağ dokusunda bulunmaktadır (Ladage vd., 2013). β -blokerler bu reseptörlere bağlanarak etkilerini bloke eder. İlk nesil β -blokerler seçici değildir. İkinci nesil blokerler β_1 reseptörlerine karşı yüksek afiniteye sahiptir. En yaygın kullanılan β_1 blokerler bu projede de analit grubu olarak önerilen metoprolol (MET), atenolol (ATE) ve esmolol (ESM)'dür (Şekil 10) (Tsuchiya vd., 2013).



Şekil 10. Tayini amaçlanan β -bloker ilaç etken maddeleri

Adrenalin ve noradrenalin kalpteki β_1 reseptörleri uyarıp kalp atım hızını ve kan basıncını arttıran stres hormonlarıdır. Dolayısıyla her ikisi de kalp için zararlıdır (Bristow vd., 2010). Adrenalin korku ve stres altında adrenal medulla tarafından kana salınmaktadır. β_1 blokerler β_1 reseptörlerine bağlanarak adrenalin ve noradrenalinin etkisini bloke ederler. Dolayısıyla kalp hızı ve kalp kaslarının kasılmasını düşürürler. Adrenalin ve noradrenalinin bloke ederek kalp hızını, el titremesi ve terlemeyi azaltıcı özelliklerinden dolayı β_1 blokerler bilardo, dart, okçuluk ve atış gibi olimpik oyunlarda doping maddesi olarak kullanılmaktadır. Dünya Anti-Doping Ajansı sadece saydığımız olimpik oyunlarda β_1 blokerlerin kullanımını yasaklamıştır (Fitch, 2012). Böylece β_1 blokelerin kan plazması ve idrardan tayini önemli hale gelmiştir. Projede belirtildiği üzere β_1 blokerlerin (metoprolol ve atenolol) tayini için metot geliştirilmiştir.

Çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan bu ilaç etken maddelerinin eser miktarlarının tayini için metot geliştirilmesi önemlidir. Beta blokerlerin birçok spektrometrik ve kromatografik yöntemle tayini mümkündür. HPLC, LC-MS, GC-MS ve CEC-MS en sık kullanılan kromatografik tayin metotlarıdır. Kütle spektrometrenin detektör olarak kullanıldığı analizlerde daha hassas sonuçlar elde edilmiştir. Yüzey ve atık suların incelenmesinde OASIS HLB ticari katı faz ekstraksiyon kartuşu beta-bloker ve antiülser ilaçların etken maddelerinin tayininde LC-MS ile birlikte kullanılmıştır (Hernando vd., 2007). Yüzey ve atık sularda tayin limitleri (LOD) 2–17 ng/L arasındadır. Bir başka çalışmada, idrar numunesinde 23 farklı madde (beta-bloker, flavonoid isofloven ve metabolitleri) GC-MS ve OASIS HLB katı faz ekstraksiyon (SPE) kartuşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Magiera vd., 2011); tayin limiti 0.6 and 9.7 ng/mL civarındadır. Baranowska vd. (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada insan idrar numunesindeki çeşitli beta blokerlerin (sotalol, carvediol milrinone, metaprolol, propranol ve metabolitleri 5`-hydroxyphenyl-carvedilol, O-desmethylcarvedilol, 4-hydroxypropranolol, α -hydroxy-metoprolol, o-desmethyl-metoprolol) tayininde OASIS HLB katı faz ekstraksiyon kartuşu ve UHPLC-DAD kullanılmıştır. Analiz sırasında UV detektör ve gradyan mobil faz kullanılmıştır. Bahsedilen idrar numunesindeki beta blokerlerin derişimi ng/mL düzeyindedir.

Son yıllarda beta blokerlerin ayrılması/tayininde kapiler elektrokromatografi (CEC) tekniği ön plana çıkmıştır. En çok tercih edilen kapiler elektrokromatografik metotlardan biri miselar elektrokinetik kapiler kromatografidir (MEKC). Bu yöntem ile nötral yapıdaki analitlerin ayrımı da mümkün olur. Kritik misel derişiminin (CMC) üstünde bir derişimde yüzey aktif madde CE tampon bölgesine eklenir. Eklenen yüzey aktif maddelerin oluşturduğu misel agregatları ile ayırım sağlanır.

Kolon tercihi CEC tekniğinin en önemli yanıdır. Monolitik kolon en çok tercih edilen kolon çeşididir. Lu vd. (2008) insan idrarında beta bloker tayini için basınç yardımcı CEC (pressure assisted capillary electrochromatography, pCEC) ve kütle spektrometriyi birlikte

kullanmışlardır. Tayin limitleri 0.15–0.80 ng/mL civarındadır. Sol-jel metodu kullanılarak silika bazlı monolitik kolon (100 µm I.D. ve 58 cm uzunluk) hazırlanmış ve propranolol, esmolol, metoprolol, bisoprolol, carteolol, celiprolol ve atenolol gibi beta blokerlerin derişimleri belirlenmiştir. Zaidi vd. (2011) moleküler baskılanmış polimer (MIP) ile kaplanmış kapiler kolonları beta bloker tayininde kullanmıştır. Şablon molekül olarak atenolol, monomer olarak metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EDMA), polimerizasyon başlatıcı olarak azo-bisisobutyronitrile (AIBN) seçilmiştir. Silika bazlı kolon MIP çözeltisi ile kaplanmıştır. CEC ile birlikte sıralı diyot detektör kullanılmıştır.

1.4 Çalışmanın Amacı

Çalışmanın temel amacı, seçilen üç farklı ilaç etken maddesinin kapiler elektroforez ve kapiler elektrokromatografi ile tayinine yönelik yeni kolonlar ve metotlar geliştirmektir. Kolon dolgu maddeleri iki farklı yöntem takip edilerek sentezlenmiştir. Sol-jel tekniği; silika ve fonksiyonellendirilmiş silika (amino ve fenil grupları ile) durağan fazların sentezi için kullanılan yöntemlerden biridir. Moleküler baskılama yöntemi hem organik durağan fazın (MIP) hem de inorganik durağan fazın (MIIP) üretimi için kullanılmıştır. Tüm sentezlenmiş kapiler kolon içi dolgu malzemeleri, CE-DAD'den önce sorpsiyon çalışmaları tamamlanarak bağlanma oranları açısından incelenmiştir. Metot optimizasyonu için derişim, pH ve tampon çözeltisinin tipi, enjeksiyon parametreleri (basınç, voltaj ve süre), kolon sıcaklığı, voltaj gibi deneysel parametreler optimize edilmiştir. Sorpsiyon performanslarının sonuçlarına göre, her bir kategori için sentezlenen materyallerden biri seçilmiş ve kapiler kolon bunlarla doldurulmuştur. Sabit fazların kaplama katmanı sayısı, kapiler kolon içine sabit fazın enjekte edilme yöntemi ve reaksiyonun başlangıç noktası (kapiler içi ve dışı olmak üzere) değiştirip ve optimize edilmiştir. Ortogonal analiz yapmak için ise HPLC-DAD çalışmaları yapılmıştır.



BÖLÜM 2

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Enstrümantasyon

Seçilen ilaç etken maddelerine (diüretikler, beta-blokerler ve anti-kanser ilaçları) özel kapiler kolon geliştirme çalışmalarına başlamadan önce, UV-Vis spektrometri (Varian Cary 50 scan) ile maksimum absorpsiyon veren dalga boyu belirlendi. Kromatografik ayırmlar, sıralı diyot dedektörü (DAD) (Agilent Technologies, ABD) ile eşli Agilent 1200 serisi HPLC kullanılarak yapıldı. HPLC için Supelco C18 (Lichrosphere RP 18-5, I.D.:250 mm x 4.6 mm) ve YMC C30 (250 mm x 4.6 mm) analitik kolonları kullanıldı. Kapiler elektroforez çalışmalarında, DAD dedektöre sahip Agilent 7100 serisi CE, Agilent Technologies'den alınan aktive edilmemiş silika kapiler kolonlarla birlikte kullanıldı (id. 50 µm veya 75 µm). Geliştirilen kapiler kolon dolgu maddelerinin karakterizasyonu için Quanta 250FEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Philips X'Pert Pro X-Işını Difraktometre (XRD), elementel analizler için LECO-CHNS-932 (Mönchengladbach, Germany) elementel analizörü kullanıldı.

Bazı durumlarda sorbent, Hettich EBA 12 santrifüj (Tuttlingen, Almanya) ile çözüldü; Elmasonic S 80 H ile ultrasonikasyon yapıldı. Hazırlanan çözeltilerin pH'sı Ino Lab Level 1 pH metre (Weilheim, Almanya) ile ayarlandı. Orbital çalkalayıcı olarak kullanılan cihaz IKA yellow line OS 5 (Staufen, Almanya)'dir. Fotopolimerizasyon için UV kaynağı olarak OSRAM ULTRA VITALUX 300W 230V E27 (ultraviolet high pressure lamp) kullanıldı. Çalışma boyunca ultra saf su (18.2 MΩ, Millipore, Billerica, MA, ABD) kullanıldı. İlaç etken maddelerinin stok çözeltileri (100.0 ve 1000.0 mg/L) metanol içinde hazırlanıp +4°C'de buzdolabında saklandı.

2.1.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri

2.1.1.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları

HPLC-DAD ile optimizasyon çalışmalarında anti-kanser ilaç etken maddeleri grubuna ait 5-florourasil, 5-azasitidin ve gempitabin kullanıldı. Bu maddelerin stok çözeltileri 500.0 mg/L olacak şekilde metanol içinde hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler amber şişelerde buzdolabında (4°C) saklandı. Deneyler öncesinde analitler uygun seyreltmelerle istenen derişime (5.0 mg/L) getirildi.

Çalışmaların devamında 5-florourasil, 5-azasitidin ve gemsitabin için hazırlanan çalışma çözeltilerinin UV-Vis spektrumları alınarak maksimum absorbans ve düzgün pik veren dalgalı boyları seçildi. Maksimum absorbans dalgalı boyları, 5-florourasil, 5-azasitidin ve gemsitabin için sırasıyla 275 nm, 254 nm, 280 nm olarak belirlendi. Ancak, çalışma kolaylığı açısından, ölçümlerde, her biri için maksimum absorbans veren dalgalı boyu değil de bu üç maddenin de yeterli absorbans verdiği 220 nm kullanıldı. HPLC-DAD çalışma parametreleri Tablo 3’de verilmektedir.

Tablo 3. Anti-kanser ilaç etken maddeleri için HPLC-DAD çalışma parametreleri

5-florourasil, 5-azasitidin ve gemsitabin	
Kolon	Supelco C18 (250 mm x 4.6 mm) YMC C30 kolon (250 mm x 4.6 mm)
Mobil faz (C18 kolonu için)	70:30 metanol:su
Çalışılan dalgalı boyları	220, 230, 254, 275, 280 nm
Mobil faz (C30 kolonu için)	10:90 metanol:su (fosfat tamponu, pH 7.0) 10:90 asetonitril:su (pH 5.0)
Termostat sıcaklığı	25.0 °C
Numune enjeksiyon hacmi	20 µL
Mobil faz akış hızı	0.6, 0.7, 0.8 ,0.9 mL/min
Analit derişimi	1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L

2.1.1.2 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları

Anti-kanser ilaç etken maddelerinden 5-azasitidin ve 5-florourasil için kapiler elektroforez (CE) çalışmaları yapıldı. Diğer anti-kanser ilacı gemsitabin, hem maliyeti hem de tedarik süresinin uzunluğu nedeniyle optimizasyon çalışmalarında yer almadı. Adı geçen iki etken maddenin standart çözeltileri (10.0 mg/L) hem suda hem de borat tamponu içerisinde hazırlandı ve UV spektrumları alındı. Sulu çözeltilerde en uygun dalgalı boyu 5-azasitidin için 234 nm, 5-florourasil içinse 270 nm olarak belirlendi. Borat tamponu içerisinde ise en uygun dalgalı boyu 5-azasitidin için 225 nm, 5-florourasil için 270 nm olarak tespit edildi.

Absorbans spektrumları alındıktan sonra CE çalışmalarına geçildi ve pik ayrımını etkileyen faktörlerden tampon çözelti derişimi ve pH optimizasyon çalışmalarına başlandı. Uygulanan parametreler Tablo 4’te verilmektedir. Efektif uzunluğu 53 cm olan 60 cm’lik 75.0 µm iç çaplı

Tablo 4. Anti-kanser ilaç etken maddeleri için CE çalışma parametreleri

Analitik kolon	Agilent Technologies, FS, undeactivated (75 µm i.d. column)
Kaset sıcaklığı	30.0 °C
Enjeksiyon basıncı	50.0, 60.0 mbar
Enjeksiyon zaman aralığı	5.0, 10.0 s
Güç, akım	6.0 W, 300.0 µA
Voltaj	20.0 kV
Ölçüm dalgaboyu	234 nm, 270 nm
Elektrolit çözeltisi	25.0 mM borat tamponu (pH 9.5, 10.5, 11.5) 10.0 mM borat tamponu (pH 9.5, 10.5, 11.5)
Analit derişimi	1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L

silika kapiler kolonlar (Agilent Technologies FS, undeactivated-0.75 mm) kullanıldı. Silika kolondan, şartlandırma işlemi için sırasıyla MeOH (10.0 min), 1.0 M NaOH (10.0 min), 0.1 M NaOH (10.0 min), deiyonize su (10.0 min) ve borat tamponu (1.0 min) geçirildi ve her enjeksiyondan sonra kolon 4.0 min süreyle borat tamponu ve 2.0 min süreyle 0.1 M NaOH çözeltisi ile temizlendi.

2.1.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri

2.1.2.1 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları

Daha önce de belirtildiği gibi, seçilen anti-kanser ilaçlara ek olarak ağrı kesici ilaç etken maddelerinin tayini için de çalışma yapılmasına karar verildi. Bu amaçla diklofenak, ketoprofen ve naproksen için HPLC-DAD optimizasyon deneyleri yapıldı.

Bu maddelerin stok çözeltileri 500.0 mg/L olacak şekilde metanol içinde hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler amber şişelerde ve buzdolabında (4°C) saklandı. Analitler, deneyler öncesi uygun seyreltmelerle çalışma derişimine getirildi. Diklofenak, naproksen ve ketoprofen için analizler sabit faz C18 kolonu (Supelco C18, 250 mm x 4.6 mm) ve mobil faz 85:15 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) kullanılarak gerçekleştirildi.

2.1.2.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları

CE-DAD çalışmaları kapsamında 5.0 mg/L olarak hazırlanan diklofenak, naproksen ve ketoprofen çözeltileri önce ayrı ayrı daha sonra ise karışım olarak ölçüldü. Proje önerisinde belirtildiği gibi, CE çalışmalarında ayrımı etkileyen faktörlerin optimizasyonu için çalışmalar yapıldı (Tablo 5). Önce pH 9.0 tampon çözeltisi hazırlanıp, 50 cm uzunluğunda kesilen kolon aktive edildi. Bu çalışmalar, kantitatif sonuçlar almaktan ziyade, ilk aşamada süregelen deneylere öncül olması ve CE (ve CEC) tekniğine alışma/tecrübe için gerçekleştirildi.

Tablo 5. Ağrı kesici ilaç etken maddeleri için CE çalışma parametreleri

Analitik kolon	Agilent Technologies, FS, undeactivated (75 µm i.d. column)
Kaset sıcaklığı	30.0 °C
Enjeksiyon basıncı	10.0, 35.0 mbar
Enjeksiyon zaman aralığı	5.0 s
Güç, akım	6.0 W, 300.0 µA
Voltaj	20.0 kV
Ölçüm dalgaboyu	280 nm
Tarama hızı	2.0, 2.5 Hz
Elektrolit çözeltisi	10.0 mM borat tamponu (pH 9.0)

2.1.3 Diüretik İlaç Etken Maddeleri

2.1.3.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD çalışmaları

Çalışma kapsamında diüretik ilaç etken maddeleri için test edilen HPLC-DAD parametreleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Pik ayrımı ve düzeltmede karşılaşılan sorunlardan dolayı HPLC-DAD için deteksiyon limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) hesaplamaları tekrarlanmaktadır.

Tablo 6. Diüretik ilaç etken maddeleri için HPLC-DAD çalışma parametreleri

Bendroflumetiazid, Hidroklorotiazid, Klorotiazid	
Kolon	Supelco C18 (250 mm x 4.6 mm)
Mobil faz	80:20 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) 80:20 metanol:su (fosfat tamponu, pH 6.0)
Termostat sıcaklığı	30.0 °C
Numune enjeksiyon hacmi	20.0 µL
Standart derişimleri	1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/L
Mobil faz akış hızı	0.7, 0.8, 0.9 mL/min

2.1.3.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD çalışmaları

Çalışma kapsamında diüretik ilaç etken maddeleri için test edilen CE-DAD parametreleri Tablo 7'de gösterilmektedir. Her analizden önce, kapiler kolonu koşullandırma amacı ile belirlenen sabit bir dizi adım uygulandı. Belirlenen koşullandırma adımları sırasıyla şöyledir; 5 dakika MeOH ile yıkama, 5 dakika UPW ile yıkama, 5 dakika 1 M NaOH ile yıkama, 5 dakika 0.1 M NaOH ile yıkama, 5 dakika UPW ile yıkama ve 5 dakika tampon çözelti ile yıkama. Ayrıca, her 4 enjeksiyondan sonra tekrarlanabilirliği sağlamak için koşullandırma adımları uygulandı.

Tablo 7. Diüretik ilaç etken maddeleri için CE çalışma parametreleri

Kolon	Agilent Technologies, FS, undeactivated column (50 µm iç çap, 50 µm ışın yolu, 57 cm kolon uzunluğu, 50 cm etkin uzunluk)
Kaset Sıcaklığı	25.0, 30.0 °C
Enjeksiyon Basıncı	50.0, 60.0 mbar
Enjeksiyon Süresi	5.0, 10.0 s
Güç, Akım	6.0 W, 300 µA
Voltaj	10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0 kV
Tarama Hızı	0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5.0 Hz
Elektrolit çözeltisi	25.0 mmol borat tamponu (pH 9.3), 10.0 mmol borat tamponu (pH 9.2, 9.3, 9.4, 9.5) 25.0 mmol fosfat tamponu (pH 7.0)
Timeable Özelliği	Kapalı ve 6.8/6.7/6.6 saniyede voltajı 15kV'ye çevir
Analit derişimi	0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L

2.1.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri

2.1.4.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD çalışmaları

Enstrümantal parametrelerin optimizasyon çalışmaları için öncelikle 1000.0 mg/L'lik stok çözeltiler hazırlandı ve amber şişelerde buzdolabında (4°C) saklandı. Deneylerde gerekli derişimler, uygun seyreltmelerle metanol-su karışımı içinde hazırlandı. Deneylere öngörülen tüm β -bloker maddeleriyle başlandı. Uygulanan şartlar altında, aralarında polarite farkı olmadığı için, metoprolol, atenelol ve esmolol için ayırım elde edilemedi ve pikleri çakıştı. Daha önce de bahsedildiği üzere, bu bölümdeki HPLC çalışmalarına çeşitli ağrı kesici ilaç etken maddelerinin (ketoprofen ve ibuprofen) eklenmesiyle devam edildi. Tüm analizler Agilent HPLC-DAD 1200 serisi ile yapıldı. Optimizasyon parametreleri Tablo 8'de gösterilmektedir.

Tablo 8. β -bloker ilaç etken maddeleri için HPLC-DAD çalışma parametreleri

Metoprolol, ketoprofen, ibuprofen	
Kolon	Supelco C18 (Lichrosphere RP 18-5, 25 cm x 4.6 mm) kolon
Mobil faz	85:15 metanol:su (asetik asit, pH:3.0)
Termostat sıcaklığı	30.0 °C
Numune enjeksiyon hacmi	20.0 μ L
Mobil faz akış hızı	0.9 mL/min
Analit derişimi	0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 250.0 mg/L

2.1.4.2. β -bloker İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD çalışmaları

β -bloker ilaç etken maddelerinin tayini için kullanılan CE-DAD parametreleri Tablo 9'da verilmektedir. Her çalışmadan önce kapiler kolona bir şartlandırma metodu uygulandı. Erimiş (fused) silika kapiler borunun/kolonun iç duvarı silanol (Si-OH) grupları içerir. Kolondan yüksek pH'ya sahip bir elektrolit çözeltisi geçirildiğinde yüzey negatif hale getirilmektedir. Bu sebeple çalışmalardan önce kolon şartlandırılması yapılmalıdır. Şartlandırma basamakları sırasıyla; 5 dakika boyunca MeOH ile yıkama, 5 dakika boyunca deiyonize su ile yıkama, 5 dakika boyunca 1.0 M NaOH çözeltisi ile yıkama, 5 dakika boyunca 0.1 M NaOH çözeltisi ile yıkama, 5 dakika boyunca deinoze su ile yıkama ve 5 dakika boyunca elektrolit çözeltisi ile yıkamadır.

Tablo 9. β -bloker ilaç etken maddeleri için CE-DAD çalışma parametreleri

Elektrolit çözeltisi	25.0 mM borat tamponu (NaOH pH, 9.5)
Kolon	Agilent Technologies, FS, (75 μ m id, 57 cm kolon uzunluğu, 50 cm efektif uzunluk)
Kaset sıcaklığı	25.0 °C
Enjeksiyon basıncı ve süresi	50.0 mbar, 5 s
Voltaj, Güç, Akım	20.0 kV, 6.0 W, 300.0 μ A
Tarama hızı	2.5 Hz

2.2 Kaplama Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu

2.2.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

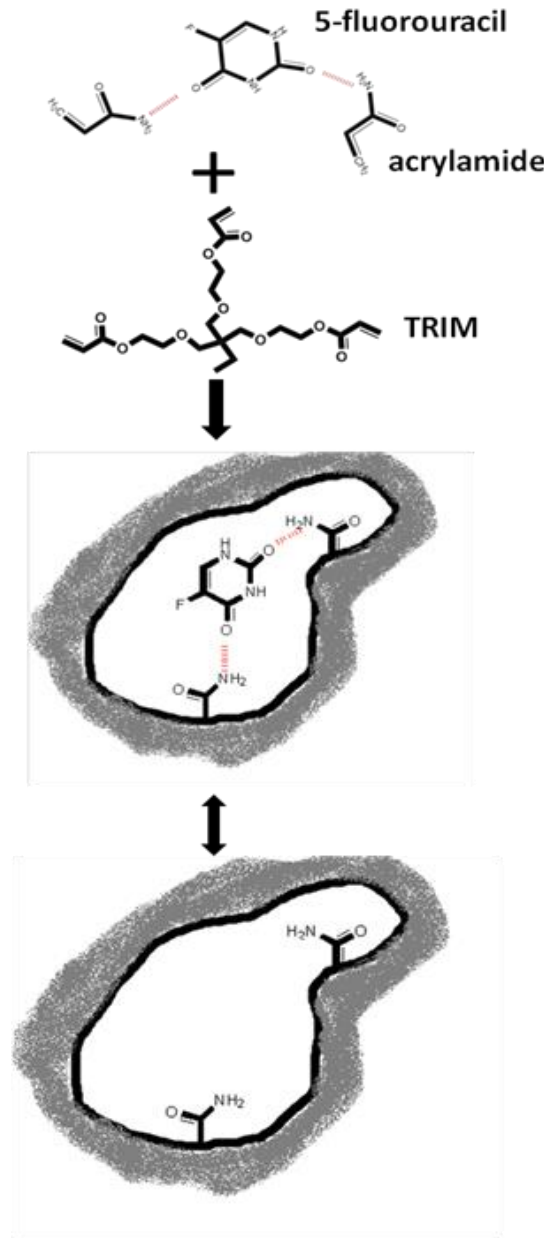
Çöktürme polimerleşme metodu kullanılarak 5 farklı MIP monolit sentezlendi. Moleküler baskılanmış polimerler ve moleküler baskılanmamış polimer eşleri, farklı oranlarda bileşenler ve fonksiyonel monomerler kullanılarak sentezlendi. Ayrıca, birbiriyle eş boyutta MIP/NIP mikro/nanoküreler çöktürmeli polimerleşme yoluyla sentezlendi.

2.2.1.1 Akrilamid ile Monolitik MIP/NIP Sentezi

MIP/NIP monolit sentezi 3 farklı oran (1:1:20), (1:4:20) ve (1:8:20) kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak 1:1:20 oranında polimer çözeltisi hazırlandı. 1.0 mmol 5-FU 5.0 mL DMSO'da çözüldükten sonra şablon molekül ile fonksiyonel monomerin kovalent olmayan etkileşime girmesi için oda sıcaklığında 1.0 mmol akrilamid (AA) eklendi. Daha sonra reaksiyon sistemine 20.0 mmol TRIM ve azot gazı altında 2.0 % mol AIVN eklendi. Polimerleşmenin gerçekleşmesi için sistem sıcaklığı 60.0 °C olarak sabitlendi. Elde edilen katı yığın polimer 24 saat boyunca 60.0 °C'de inkübe edildi. Kurumuş malzeme ezilip parçalanarak 150.0 μ m paslanmaz çelik elekten geçirildi ve şablon molekülün geri alınması için sokslet sistemine yerleştirildi. Bunun için ilk 48 saat asetik asit-metanol karışımı (1:1, 200.0 mL), daha sonra da 48 saat metanol kullanıldı. Şablon molekülün MIP'den tamamen alınmasından sonra monolit 60.0 °C'de kurumaya bırakıldı. NIP monoliti için de 5-FU kullanımı dışında aynı yöntem uygulandı.

Literatüre bakıldığında, MIP/NIP monolitlerinin sentezinde (2:16:20) oranının ve porojen olarak DMF'nin kullanıldığı görülmektedir (Puoci et al., 2007). Bazı değişiklikler yapılarak, 2.0 mmol 5-FU 4.0 mL DMF'de çözüldü. Oda sıcaklığında 16.0 mmol AA eklendi. Daha sonra 20.0 mmol

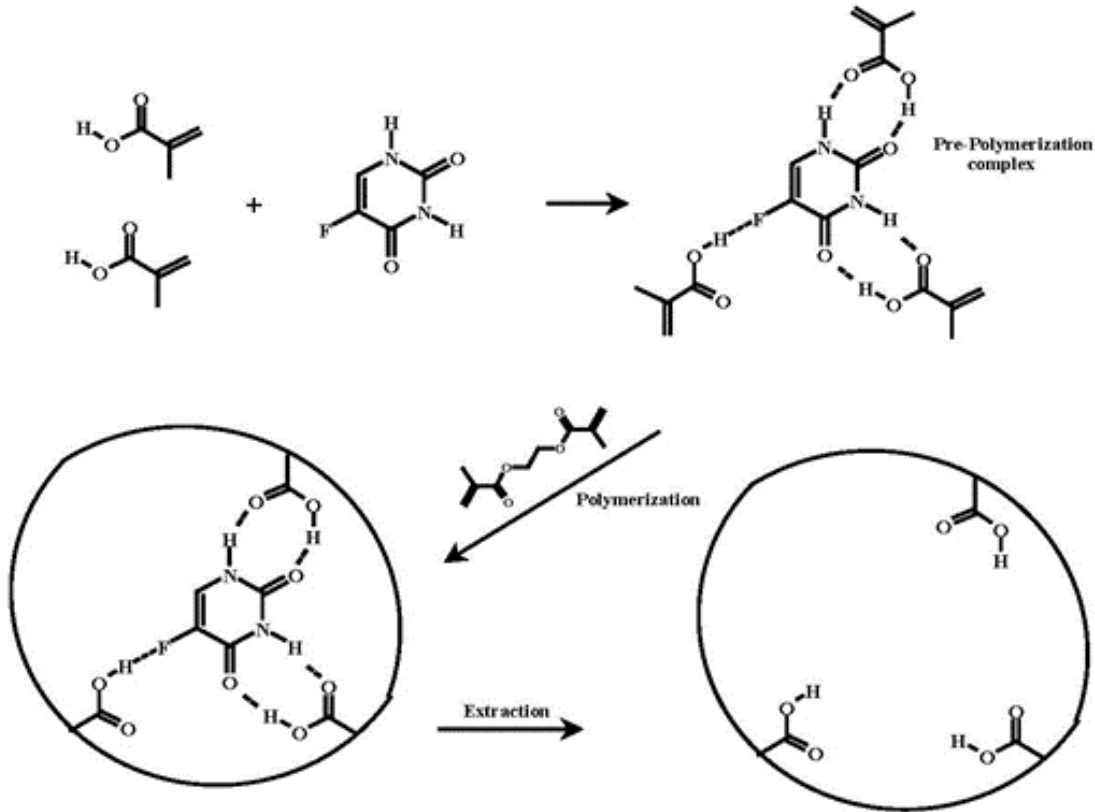
TRIM ve azot gazı altında 2.0% mol AIVN eklendi. Polymerleşme için reaksiyon sistemi 60.0 °C'ye sabitlendi. Elde edilen katı yığın polimer 24 saat 60.0 °C'de inkübe edildi. Kurutma işlemi sonrası katı ezilip parçalanarak 150.0 µm paslanmaz çelik elekten geçirildi. Sentezlenmiş polimerden şablon molekülün geri alınması için sokslet sistemi kullanıldı. Sistemden ilk 48 saat boyunca asetik asit-metanol karışımı (1:1, 200.0 mL), daha sonra da 48 saat metanol (200.0 mL) geçirildi. Şablon molekülün polimerden tamamen alınması sonrasında monolit 48 saat boyunca 60.0 °C sıcaklıkta kurumaya bırakıldı. NIP monoliti için de 5-FU eklenmesi dışında aynı yöntem uygulandı. Şekil 11'de olası sentez mekanizması verilmektedir.



Şekil 11. Monomer olarak akrilamid kullanımıyla 5-FU baskılanmış polimer sentezi

2.2.1.2 Metakrilik Asit ile Monolitik MIP/NIP Sentezi

MIP polimerleşme çözeltisi 1:8:20 (şablon molekül: fonksiyonel monomer: çapraz bağlayıcı) oranında hazırlandı. İlk olarak 1.0 mmol 5-FU (şablon molekül) 5.0 mL DMSO'da (porojen) çözüldü ve 8.0 mmol MAA (fonksiyonel monomer) eklenerek 1.0 saat boyunca karıştırıldı. Sonra 20.0 mmol TRIM (çapraz bağlayıcı) ve sisteme azot gazı altında 2.0 % mol AIVN (başlatıcı) eklendi. Monolit polimer elde edilmesi için sistem 60.0 °C sıcaklığa sabitlendi. Elde edilen katı yığın polimer 24 saat boyunca 60 °C'de bekletildi. Kurutma süreci sonrasında elde edilen polimer ezilip parçalanarak toz haline getirildi ve 150.0 µm paslanmaz çelik süzgeçten geçirildi. Sentezlenmiş polimerden şablon molekülün geri alınması için sokset sistemi kullanıldı. Sistemden ilk 48 saat boyunca asetik asit-metanol karışımı (1:1, 200.0 mL), daha sonra da 48 saat metanol (200.0 mL) geçirildi. Şablon molekülün polimerden tamamen alınması sonrasında monolit 48 saat boyunca 60.0 °C sıcaklıkta kurumaya bırakıldı. NIP monoliti için de 5-FU eklenmesi dışında aynı yöntem uygulandı. Olası sentez mekanizması Şekil 12'de verilmektedir.



Şekil 12. Monomer olarak metakrilik asit kullanımıyla 5-FU baskılanmış polimer sentezi

2.2.1.3 Metakrilik Asit ile MIP/NIP Mikro/Nano Küreciklerin Sentezi

MIP/NIP mikro/nano küreciklerin sentezi için bazı değişiklikler yapılarak literatürden yararlanıldı (Cirillo et. al., 2018). MIP polimerleşme çözeltisi 1:8:10 (şablon molekül: fonksiyonel monomer: çapraz bağlayıcı) oranında hazırlandı. İlk olarak 1.0 mmol 5-FU 20.0 mL metanolde çözüldü ve tamamen çözüldükten sonra 20.0 mL asetonitril eklendi. 1.0 mmol metakrilik asit (MAA) eklenerek 1.0 saat boyunca karıştırıldıktan sonra 20.0 mmol TRIM ve azot gazı altında 50.0 mg AIVN eklendi. Monolit polimer elde edilmesi için sistem 60.0 °C sıcaklığa sabitlendi. Elde edilen polimer 24 saat boyunca 60.0 °C'de bekletildi. Sentezlenmiş polimerden şablon molekülün geri alınması için sokslet sistemi kullanıldı. Sistemden ilk 48 saat boyunca asetik asit-metanol karışımı (1:1, 200.0 mL), daha sonra da 48 saat metanol (200.0 mL) geçirildi. Şablon molekülün polimerden tamamen alınması sonrasında mikro kürecikler 48 saat boyunca 60.0 °C sıcaklıkta kurumaya bırakıldı. NIP mikro kürecikleri için de 5-FU eklenmesi dışında aynı yöntem uygulandı.

Ayrıca, MIP nano kürecikleri de aynı sentez oranı (1:8:10) ve farklı miktarda porojen kullanılarak elde edildi. Bu sentezde asetonitril miktarı 20.0 mL'den 180.0 mL'ye çıkarıldı. NIP nano kürecikleri için de 5-FU eklenmesi dışında aynı yöntem uygulandı. Olası sentez mekanizması Şekil 11'de görüldüğü gibidir; ancak bu sefer asetonitril miktarındaki değişiklikten dolayı oluşan polimerin farklı bir yapıya sahip olması beklenmektedir.

2.2.1.4 Geri Bağlanma Deneyleri

MIP/NIP monolitlerinin 5-FU'ya bağlanma kapasiteleri incelendi. Farklı derişimlerdeki (1.0-500.0 mg/L) 10.0 mL 5-FU ayrı ayrı 5.0 mg MIP/NIP monolitleri üzerine eklenerek 15.0 mL santrifüj tüpleri içinde, 560.0 rpm'de 60 dakika boyunca karıştırıldı. Çalkalama sonrası karışımlar süzüldü ve süzüntüde serbest halde olan 5-FU derişimi HPLC-DAD kullanılarak belirlendi.

2.2.1.5 Seçicilik Deneyleri

Seçicilik deneyleri için 10.0 mL'de 100.0 mg/L derişimde antikanser ilaçları, 5-FU ve benzer yapıdaki 5AC kullanıldı. Bu derişimlerde 5-FU ve 5AC 100.0 mg MIP/NIP monolitleri üzerine eklendi. Sorpsiyon 560 rpm'de orbital çalkalayıcı yardımıyla 60.0 dakikada gerçekleştirildi. Sorbentin karışımdan ayrılması için selüloz asetat şırınga filtreleri kullanıldı. Ayrım sonrası analiz için HPLC-DAD kullanıldı.

2.2.1.6 Katı Faz Ekstraksiyon ile Kaplama Malzemesi Karakterizasyonu

5-FU tayininde en uygun ekstraksiyon verimini elde etmek amacıyla örnek çözelti pH'sı, sorbent miktarı ve çalkalama zamanı gibi parametreler optimize edildi.

İlk olarak pH değişiminin adsorpsiyona etkisi incelendi. Bunun için 10.0 mL'de 100.0 mg/L derişimdeki 5-FU çözeltilerinin pH'sı 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 ve 10.0'a ayarlanarak 5.0 mg MIP/NIP (1:1:20 AA, 1:4:20 AA, 1:8:20 MAA, 1:8:20 AA, 1:8:10 AA) sorbent çiftlerinin herbiriyle karıştırıldı. Sorpsiyon işlemi için orbital çalkalayıcı 60.0 dakika boyunca 560 rpm'de çalıştırıldı. Analiz için HPLC-DAD kullanıldı.

Yine 100.0 mg/L derişimde 10.0 mL'de 5-FU çözeltileri hazırlanıp, MIP miktarı 5.0 ile 100.0 mg arasında değiştirildi ve en uygun sorbent miktarı belirlendi.

Zaman aralığı 1.0 ile 120.0 dakika arasında değiştirilerek 100.0 mg MIP monolit için çalkalama süresinin sorpsiyona etkisi incelendi. Diğer parametreler sabit tutuldu ve süzüntüdeki derişimler HPLC-DAD yardımıyla belirlendi.

Sentezlenen sorbentlerin tekrar kullanılabilirliği, 100.0 mg/L 5-FU ve 100.0 mg MIP sorpsiyon/desorpsiyon döngüsüyle kontrol edildi. Her döngüden sonra sorbent kurumaya bırakıldı. Bu işlem aynı sorbent için 10 kez tekrarlandı. Optimizasyon verilerinin özeti Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 10. Katı faz ekstraksiyon çalışma parametreleri

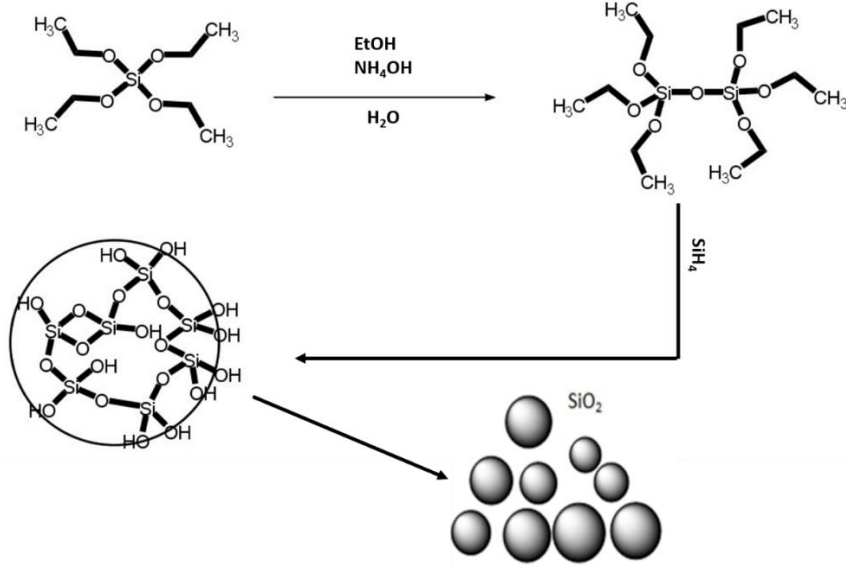
Standart derişimi	100.0 mg/L
pH	1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0
Sorbent miktarı	5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 mg
Sorpsiyon süresi	1.0, 5.0, 15.0, 30.0, 60.0, 120.0 min
Desorpsiyon çözgeni	asetik asit, metanol

2.2.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

2.2.2.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi

Silikat yapılar, Strandwitz vd. (2009) tarafından tarif edilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak sol-jel yoluyla gerçekleştirildi. İlk olarak, alkoksit çözeltisi 1000.0 µL TEOS ve 35.0 mL EtOH kullanılarak hazırlandı. Bu karışım 500 rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, jelasyonu başlatmak için baz katalizör çözeltisi eklendi (Şekil 13). Katalizör çözeltisi 7.0 mL deiyonize su ve 1.05 mL amonyum hidroksit (%25, NH₄OH) içerdi. Reaksiyon oda sıcaklığında ve 24 saat süreyle gerçekleştirildi. Fazla çözelti, karışımın 6000 rpm'de 30 dakika boyunca

santrifüjlenmesiyle ayrıldı. İlk redispersiyon işlemi için (50:50) dH₂O:EtOH karışımı kullanıldı. Çalkalanan katının tekrar santrifüj edilmesi (6000 rpm, 10 min) ile son basamağa geçildi ve yeniden dispersiyon işlemi deiyonize su kullanılarak yapıldı. Ardından 10 dakika 6000 rpm'de santrifüjlendi ve elde edilen silikat nanoparçacıklar bir gece boyunca 50.0°C'de kurutuldu. Çözücü (EtOH) ve silis kaynağı olarak kullanılan TEOS miktarı, farklı nano-boyutlu yapılar elde etmek için değiştirildi (Tablo 11).



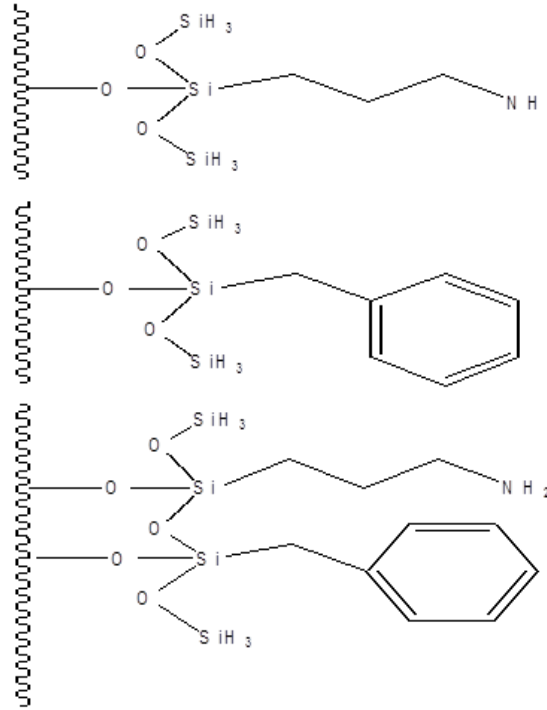
Şekil 13. Baz katalizör ve TEOS kullanımıyla silika sol jel sentezi

Tablo 11. Partikül boyutu kontrol deneyi parametreleri

	TEOS	EtOH	Deiyonize Su	NH ₃ .H ₂ O
1 No'lu deney (referans nokta)	1000 µL	35 mL	7 mL	1.05 mL
2 No'lu deney	750 µL	35 mL	7 mL	1.05 mL
3 No'lu deney	500 µL	35 mL	7 mL	1.05 mL
4 No'lu deney	250 µL	35 mL	7 mL	1.05 mL
5 No'lu deney	100 µL	35 mL	7 mL	1.05 mL
6 No'lu deney	1000 µL	15 mL	7 mL	1.05 mL
7 No'lu deney	1000 µL	25 mL	7 mL	1.05 mL
8 No'lu deney	1000 µL	45 mL	7 mL	1.05 mL
9 No'lu deney	1000 µL	55 mL	7 mL	1.05 mL

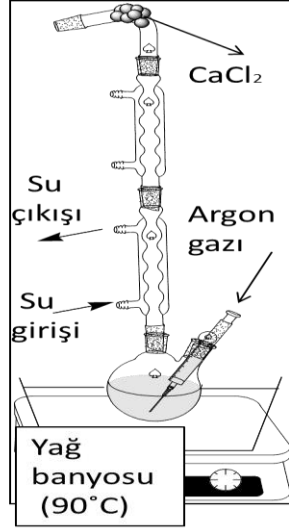
2.2.2.2 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Silikat Sorbentlerin Yüzey Modifikasyonu

Moleküller arası etkileşimlerden H-bağı, π - π istiflenme etkileşimi veya polar-polar etkileşimi sayesinde maddelerin uygun gruplarla fonksiyonlandırılmış katı yüzeylere tutunması beklenir. Bu nedenle, sol-jel yüzeyinin seçilen maddelerin sahip olduğu ortak nokta yapısına seçicilik gösterecek bir grupta modifiye edilmesi planlandı ve silika yüzeyi, amin içeren 3-aminopropiltrietoksi silan (3-APTES) ve fenil grubu içeren trietoksifenilsilan (TEPS) ile ayrı ayrı ve beraber olmak üzere modifiye edildi (Şekil 14).



Şekil 14. 3-APTES ve TEPS ile modifiye edilmiş silikat yüzeyi

Yüzey modifikasyonu literatür bilgisinden yararlanılarak ve kendi deney planımıza uygun bir şekilde modifiye edilerek yapıldı (Boyacı vd., 2011). Yeni sentezlenen nanosilika jel partiküllerinin yüzeyi, 0.01 M asetik asit ile 10 mL deiyonize su içinde 1 saat süreyle karıştırılarak aktive edildi. Daha sonra çözelti pH'sı nötr olana dek deiyonize su ile yıkandı. Aktif silika nanoparçacıkları, 24 saat 120°C'de kurutulduktan sonra reaksiyon kabına konuldu (Şekil 15). TEPS molekülleri ve 3-APTES, sıcak sentez ile yüzeye bağlandı. Bu amaçla 10 mL toluen, aktive edilmiş silika partikülleri ve modifikasyon için TEPS ve 3-APTES kullanıldı. Reaksiyon şişesinde 100 rpm'de yağ banyosunda karıştırıldı ve Ar gazı altında 90°C'ye kadar ısıtıldı. Çift yoğunlaştırıcı sistemi ve sistemin en üst kısmına kurutma ajanı (CaCl_2) konuldu.



Şekil 15. Sıcak sentez reaksiyonunda kullanılan sistem

Deneylerde, sıcaklık ve çözücü miktarı gibi parametreler sabit tutuldu. Sentezlenen modifiye silika materyallerinin kısaltmaları ve oranları Tablo 12'de verilmektedir.

Tablo 12. Silika modifikasyonu için sentez parametreleri

Sentezlenen madde	Silika nanopartikül miktarı (g)	Asetik asit hacmi (μL)	APTES hacmi (mL)	TEPS hacmi (mL)
APTES-SiO ₂	1.50	8.40	0.9	-
TPES-SiO ₂	0.50	2.80	-	0.3
A-P-SiO ₂	1.50	8.40	0.45	0.45

2.2.2.3 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu

Silikat, fonksiyonellendirilmiş silikat nanopartikülleri ve bu maddeler ile hazırlanan dolgu kapiler kolonların görüntüleri, sentezlenmiş malzemelerin morfolojilerini anlamak ve kapiler içi dolgu işleminin gerçekleştiğini kanıtlamak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alındı.

İlk olarak projenin amacına uygun ilerlemek ve gereksiz madde israfı yapmamak adına sentezlenen materyallerin diüretik ilaçlara olan seçiciliği, CE-DAD analizi öncesi katı faz ekstraksiyonu (SPE) yöntemi ile test edildi. İlk olarak sorpsiyon performansı incelendi. Devamında kapiler dolgu deneyleri, sorpsiyon performansında en tatmin edici sonuçları veren malzemeler ile sürdürüldü.

Sorpsiyon performansı deneylerinin çalışma koşulları Tablo 13'de özetlenmektedir. Sorbentler (amin modifiye silikat, fenil modifiye silikat, amin ve fenil ile modifiye edilmiş silikat ve modifiye

edilmemiş silikat) 10.0 mL örnek çözeltisine eklendi ve 24 saat 480 rpm'de çalkalandı. Daha sonra karışım, sorbentleri çözeltilerden ayırmak için filtre ucu selüloz asetat veya poliamid membranlar (0.2 µm gözenek boyutu) kullanılarak süzüldü. Çözeltiler, 10.0 mmol borat tamponu (pH 9.4) kullanılarak CE-DAD ile analiz edildi.

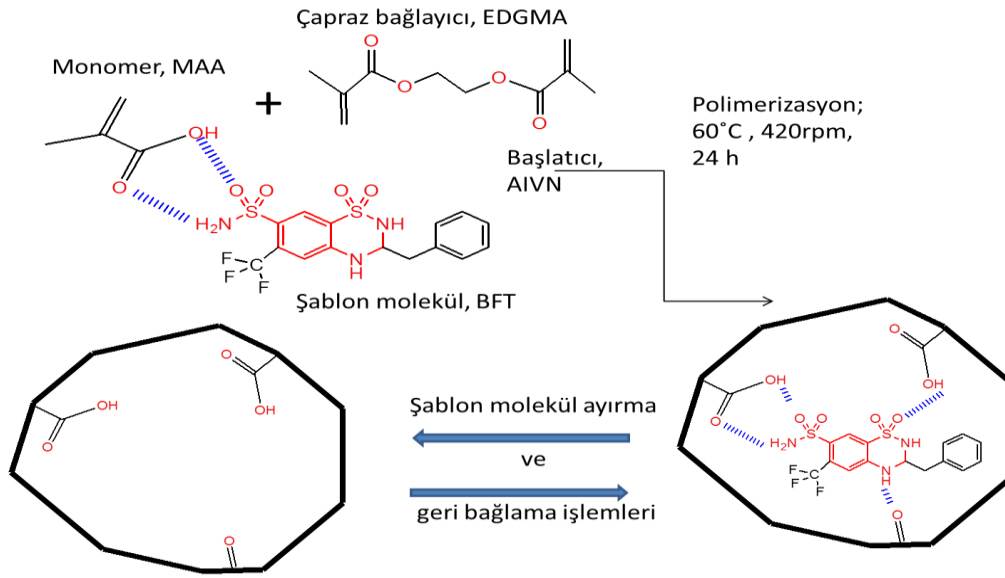
Tablo 13. Sorpsiyon performans deneylerinde kullanılan parametreler

BFT, HCT, CT karışımı standart derişimleri	0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L
Sorbent miktarı	10.0 mg
Çözelti hacmi	10.0 mL
Sorpsiyon süresi	24 saat
Çalkalama hızı	480 rpm
Sıcaklık	25.0°C

2.2.2.4 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

2.2.2.5 Organik Bazlı MIP/NIP Sentezi

Moleküler baskılanmış polimer (MIP) ve körü (moleküler baskılanmamış polimer; NIP), seçilmiş analiz molekülü (Bendroflumetiazid, BFT) için katı faz ekstraksiyon (SPE) sorbenti olarak sentezlendi. Şablon molekül olarak BFT'nin seçildiği MIP sentezinin şeması, Şekil 16'te verilmektedir. Polimerizasyon reaksiyonu, monomer olarak metakrilik asit (MA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcı olarak 4,4-azobis(4-siyano valerik asit) (AIVN) ve çözücü olarak asetonitril içerdi. İlk olarak, MIP'nin ön polimerizasyon aşamasında; 1×10^{-4} mmol BFT ve 10 mL asetonitril, amber yuvarlak dipli şişede 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra, şişeye 4×10^{-4} mmol MA ilave edildi ve 1 saat karıştırılmaya devam edildi. Ardından, 20×10^{-4} mmol EGDMA reaksiyon şişesine eklendi ve Ar gazı altında yaklaşık 10 dakika daha karıştırıldı. Reaksiyonu başlatmak için AIVN eklendi ve 5 dakika süreyle Ar gazı altında karıştırılmaya devam edildi. Reaksiyon inert bir ortamda gerçekleştirildi; sıcaklık yağ banyosu (420 rpm, 24 saat) yardımıyla 60°C'de sabit tutuldu. NIP durumunda, tüm adımlar aynı şekilde tekrarlandı; sadece şablon molekül (BFT) reaksiyon prosedüründen çıkarıldı.



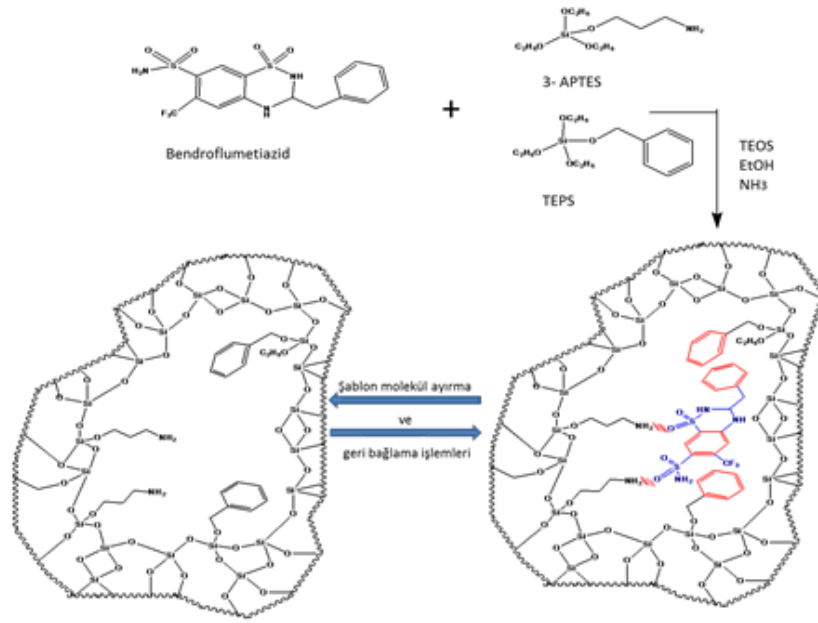
Şekil 16. MIP sentezinin ve şablon molekülün ayrılma-geri bağlanma şeması

Şablon molekülün uzaklaştırılması vakum filtrasyon sistemi ve 0,2 µm sartolon poliamid membran filtre kullanılarak yapıldı. Şablonun sorbentten tamamen çıkarılmasını sağlamak için, MIP, metanol:asetik asit (90:10, v/v) karışımı ile 10 kez yıkandı.

2.2.2.6 İnorganik Bazlı MIIP/NIIP Sentezi

Moleküler baskılanmış materyal sentez çalışmasının inorganik bölümünde, 3-aminopropiltrietoksisilan (3-APTES) ve trietoksifenilsilan (TEPS) monomer olarak kullanılıp BFT şablon molekülü olarak seçildi ve tetraetoksisilan (TEOS) çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak inorganik polimer (MIIP) ve körü (NIIP) sentezlendi (Şekil 17).

BFT molekülü ile baskılanmış silika elde etmek için 30 dakika boyunca 1.0 mmol şablon molekül 60.0 mL THF ve 10.0 mL deiyonize su karışımı içinde çözüldü. Daha sonra 450 rpm'de 4.0 mmol 3-APTES ve 4.0 mmol TEPS eklenip 30 dakika karıştırıldı. Çözeltiye 16.0 mmol TEOS ilave edilip 30 dakika daha karıştırıldı ve devamında 10.0 mL EtOH, 7.0 mL NH₃.H₂O ilave edilerek reaksiyonun gerçekleşmesi için 24 saat süre tanındı. Elde edilen parçacıkların çapı nedeniyle (nanometre boyutunda), katı fazı ayırmak için santrifüj (1800 rpm, 15 dk) uygulandı ve sıvısından ayrılan parçacıklar 24 saat 60°C'de fırında kurutuldu. Şablon molekül, sentezlenen sorbentten 90:10 MeOH:HOAc çözeltisi ile yıkanarak ve 1800 rpm'de santrifüjlenerek çıkarıldı. Şablonun tamamen uzaklaştırılması için bu adım 10 kez tekrarlandı. Elde edilen MIIP 24 saat 60°C'de kurutuldu. Prosedürün tüm basamakları, şablon molekülün eklenmesi hariç, moleküler baskılanmamış inorganik polimer (NIIP) sentezi için de uygulandı.



Şekil 17. MIIP sentezinin şematik gösterimi

2.2.2.7 Moleküler Baskılama Metodu ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu

MIP-NIP'lerin, MIIP-NIIP'lerin ve bu maddeler ile hazırlanan dolgu kapiler kolonların görüntüleri, sentezlenmiş malzemelerin morfolojilerini anlamak ve kapiler içi dolgu işleminin gerçekleştiğini kanıtlamak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alındı.

Sentezlenen malzemeler, diüretik ilaç etken maddelerine seçiciliklerinin test edilmesi amacıyla CE-DAD analizleri öncesi katı faz ekstraksiyon (SPE) sorbenti olarak kullanıldı. Çalışmanın devamında kapiler kolon doldurma işlemleri, sorpsiyon performansında en tatmin edici sonuçları veren malzemeler ile sürdürüldü.

2.2.2.8 Geri Bağlanma Deneyleri

Numuneler Tablo 14'de verilen değerler kullanılarak hazırlandı. Sorbentler (MIP, NIP, MIIP ve NIIP) ayrı ayrı 10.0 mL hacimli numune çözeltilerine konulup 24 saat 480 rpm'de çalkalandı. Daha sonra sorbent ve çözeltileri ayırmak için filtre ucu selüloz asetat veya poliamid membranlar (0.2 µm gözenek boyutu) kullanıldı ve geri kazanılan sıvılar 10.0 mM borat tamponu (pH 9.4) kullanılarak CE-DAD ile analiz edildi.

Tablo 14. Geri bağlanma çalışmalarında kullanılan parametreler

BFT standart derişimi	0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 mg/L
Sorbent miktarı	10.0 mg
Çözelti hacmi	10.0 mL
Sorpsiyon süresi	24 saat
Çalkalama hızı	480 rpm
Sıcaklık	25.0 °C

2.2.2.9 Seçicilik Deneyleri

Hazırlanan sorbentlerin seçiciliklerini incelemek üzere 100.0 mg/L derişiminde bendroflumetiazit, hidroklorotiazit ve klorotiazit karışımları hazırlandı. Standart çözeltiler (10.0 mL) ayrı ayrı sorbentlerin (MIP, NIP, MIIP ve NIIP) üzerine eklendi ve 24 saat boyunca orbital çalkalayıcı ile 480 rpm'de çalkalandı. Süzme işleminde selüloz asetat veya poliamid membranlar (0.2 µm) kullanıldı. Çözeltiler 10.0 mM borat tamponu (pH 9.4) kullanılarak CE-DAD ile analiz edildi. Kullanılan sorpsiyon parametreleri Tablo 15'de verilmektedir.

Tablo 15. Seçicilik çalışmalarında kullanılan parametreler

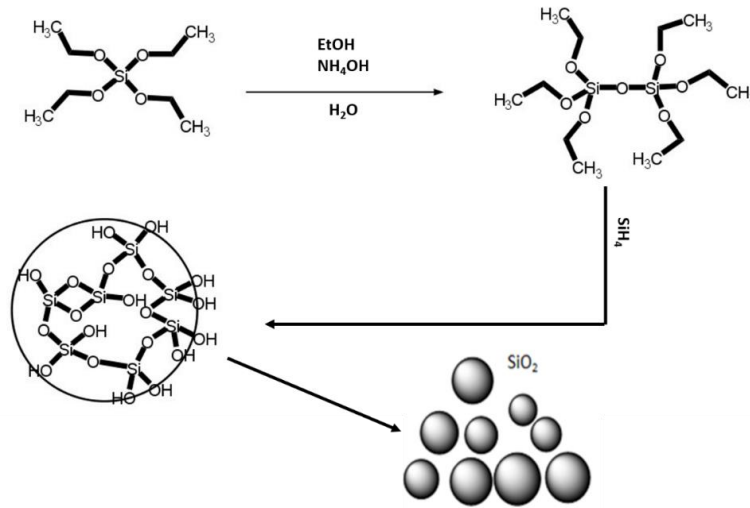
BFT, HCT, CT standart derişimi	100.0 mg/L
Sorbent miktarı	10.0 mg
Çözelti hacmi	10.0 mL
Sorpsiyon süresi	24 saat
Çalkalama hızı	480 rpm
Sıcaklık	25.0°C

2.2.3 β-bloker İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

2.2.3.1 β-bloker İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi

Proje önerisinde belirtildiği gibi, SPE sorbenti hazırlama yöntemlerinden biri de sol-jel sentezidir. Moleküller arası etkileşimler sayesinde (hidrojen bağı, polar-polar etkileşimi, π-π istiflenme etkileşimi) şablon molekülün uygun gruplarla fonksiyonlandırılmış sorbent yüzeyine

tutunması beklenir. Sentezlenen 3. SPE sorbentinde yüzey fonksiyonlandırılması yapılmadan sol-jel yüzeyinin metoprolol karşı sorpsiyonu araştırıldı. Silikat yapılar, Strandwitz vd. (2009) tarafından oluşturulan metot kullanılarak sentezlendi (Şekil 18). Sol-jel sentezinde ilk basamak alkoksit çözeltisinin hazırlanmasıdır. Alkoksit çözeltisi 60.0 mL etanol ve 1000.0 μ L TEOS, katalizör çözeltisi ise 10.0 mL deionize su ve 1.05 mL %26'lık $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlandı. Daha sonra bu iki çözelti karıştırıldı ve jelleşme işlemi gerçekleştirildi. Reaksiyon oda sıcaklığında ve 24 saat boyunca devam ettirildi. Sorbent, santrifüj (6000 rpm 10 min) ile çözeltiden ayrıldı. Elde edilen silikat nanoparçacıkları, bir gece boyunca 60.0°C'de kurutuldu.



Şekil 18. Baz katalizör ve TEOS kullanımıyla silika sol-jel sentezi

2.2.3.2 Sol-jel Senteziyle Üretilen Silikat Sorbentin Karakterizasyonu

Sentezlenen yüzeyi modifiye edilmemiş silikat nanopartiküllerin sorpsiyon performansını test etmek için katı faz ekstraksiyon (SPE) yöntemi kullanıldı. Silikat nanopartiküllerin beta blokerlere özgü bir tutma alanı olmadığı için seçicilik deneyleri yapılmadı. Sorpsiyon performans deneylerinin çalışma koşulları Tablo 16'da verilmektedir.

Tablo 16. Silikat nanopartikülleri ile sorpsiyon çalışmalarında kullanılan parametreler

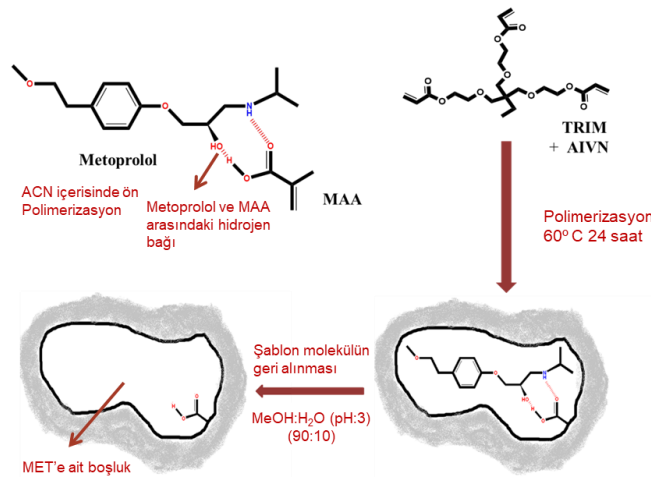
Metoprolol standart derişimi	1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0 mg/L
Sorbent miktarı	10.0 mg
Çözelti hacmi	10.0 mL
Çalkalama süresi	24 saat
Çalkalama hızı	560 rpm
Sıcaklık	25 °C

2.2.3.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için MIP/NIP Sentezi

2.2.3.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Organik Bazlı MIP/NIP

Kaplama sorbenti olarak kullanılmak üzere farklı morfolojilere sahip iki farklı moleküler baskılanmış polimer ve baskılanmamış polimer (kör) metoprololün biyolojik sıvılardan ayrılması amacıyla sentezlendi. Farklı miktarlarda çözügen kullanımı MIP/NIP'lerin morfolojilerini belirlediği için bu konuya dikkat edildi. Oluşan polimer ağının morfolojisi için toplam monomerin çözügene oranı (w/v, toplam monomer/çözügen) önemli bir parametredir. Bu oran %5'ten küçük olursa, küresel şekilli parçacıklar elde edilir. Çözügen miktarı arttıkça oluşan polimer ağı yekpare görünümünden küresel şekilli parçacıklara geçer. İki ayrı morfoloji elde etmek için çözügen miktarları 200.0 ve 50.0 mL seçildi. Sentez için 0.5 mmol metoprolol (şablon) ve 4.0 mmol MAA (fonksiyonel monomer) 200.0 mL asetonitril içerisinde çözüldü. Bir saat sonra 20.0 mmol TRIM (çapraz bağlayıcı) reaksiyon ortamına eklendi. Argon gazı altında 0.48 mmol AIVN (başlatıcı) eklendi ve çözünen oksijenin reaksiyon ortamından uzaklaşması için bir süre daha argon gazı gönderilmeye devam edildi. Polimerleşmenin gerçekleşmesi için reaksiyon karışımı 60°C yağ banyosunda bir gün boyunca bekletildi.

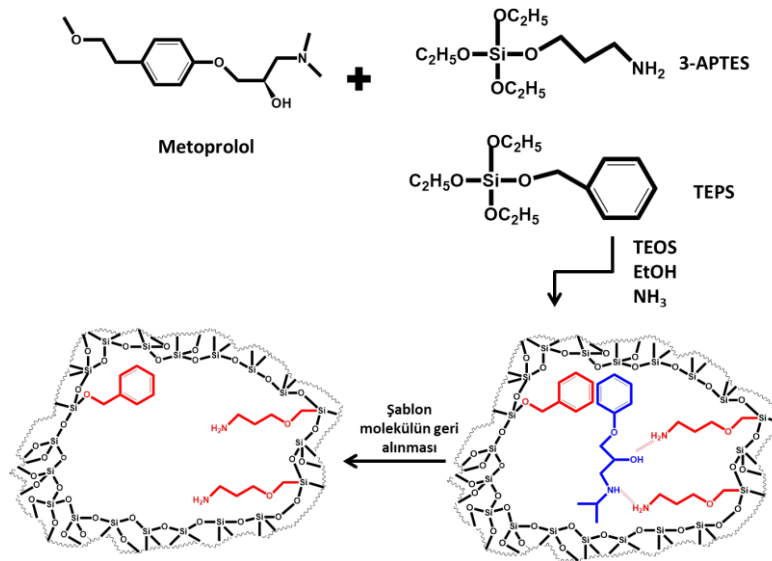
Polimerleşme sonrasında MIP200 olarak isimlendirdiğimiz sorbent elde edildi. Şablon molekül metoprololün uzaklaştırılması için ve metoprolole ait spesifik boşluklar elde edilmesi için yıkama işlemi metanol/asetik asit (9:1) karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Şablon molekülün uzaklaştırılmasından sonra MIP sorbenti 60°C de kurutuldu. NIP200 sorbenti şablon molekül eklenmeden MIP200 ile aynı deney koşullarında sentezlendi. MIP50/NIP50 sentezi 50.0 mL asetonitril kullanılarak gerçekleştirildi. Metoprolol için izlenen sentez şeması Şekil 19'da verilmektedir.



Şekil 19. Metoprolol için izlenen MIP sentez mekanizması

2.2.3.5 β -blokerler için İnorganik Bazlı MIIP/NIIP

Çalışmanın ikinci kısmında, moleküler baskılanmış inorganik polimer (MIIP) sentezlendi (Şekil 20). İlk olarak 0.5 mmol metoprolol 70.0 mL tetrahidrofuran (THF):deinoze su (6:1) karışımı içinde çözüldü. Daha sonra, 4.0 mmol trietoksifenilsilan (TPES) ve 3-aminopropiltrietoksilan (APTES) (fonksiyonel monomer) reaksiyon ortamına eklendi. Bir saat sonra 16.0 mmol tetraetil ortosilikat (TEOS) çapraz bağlayıcı olarak eklendi. 30 dakika sonra, 7.0 mL amonyak (%25 w/w) ve 10.0 mL etanol eklenip 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmaya bırakıldı. Elde edilen sorbent bir gün boyunca 60°C fırında kurutuldu. Bir önceki bölümde açıklandığı gibi şablon molekülün polimerden uzaklaştırılması ve seçici boşlukların oluşturulması için yıkama çözeltisi olarak metanol:deinoze su (50:50) karışımı kullanıldı. Şablonun tamamen kaldırılması için bu adım 10 kez tekrarlandı. Yıkama işlemlerinden sonra sorbent, santrifüj (1800 rpm) ile çözüldüden ayrıldı.



Şekil 20. Metoprolol için sentezlenen MIIP şeması

2.2.3.6 β -blokerler için Sentezlenen MIP/NIP'lerin Karakterizasyonu

MIP-NIP'lerin, MIIP-NIIP'lerin ve bu maddeler ile hazırlanan dolgu kapiler kolonların görüntüleri, sentezlenen malzemelerin morfolojilerini anlamak ve kapiler içi dolgu işleminin gerçekleştiğini kanıtlamak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alındı.

2.2.3.7 Geri Bağlanma Deneyleri

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, moleküler baskılama yöntemiyle sentezlenmiş sorbentlerde (MIP, NIP, MIIP, NIIP) metoprolole özgü bağlanma alanlarının olup olmadığını araştırmak için geri bağlanma deneyi yapıldı. Geri bağlanma deneylerinin çalışma koşulları Tablo 17’de verilmektedir.

Tablo 17. β -blokerler için geri bağlanma deneylerinde kullanılan çalışma parametreleri

Metoprolol standart derişimi	1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0 mg/L
Sorbent miktarı	10.0 mg
Çözelti hacmi	10.0 mL
Çalkalama süresi	24 saat
Çalkalama hızı	560 rpm
Sıcaklık	25 °C

2.2.3.8 Seçicilik Deneyleri

Sentezlenen sorbentlerin metoprolole seçici olup olmadığı ketopron ve ibuprofen varlığında test edildi. Çalışma koşulları Tablo 18’de verilmektedir. Seçicilik deneyleri için 50.0 mg/L metoprolol, ketoprofen ve ibuprofen çözeltileri hazırlandı. Sonrasında 10.0 mL çözelti 10.0 mg MIP/NIP sorbenti ile karıştırıldı. Sorpsiyon 24 saat süreyle orbital çalkalayıcıda gerçekleştirildi.

Tablo 18. β -blokerler için seçicilik deneylerinde kullanılan çalışma parametreleri

Standart derişimi	50.0 mg/L
Sorbent miktarı	10.0 mg
Çözelti hacmi	10.0 mL
Çalkalama süresi	24 saat
Çalkalama hızı	560 rpm
Sıcaklık	25.0 °C

2.2.3.9 Elementel Analiz

Elementel analiz cihazı yüksek sıcaklıklarda yakma ve ağırlık ölçümü prensibine dayanır. Katı, sıvı ve gaz örneklerinde bulunan organik/inorganik maddelerin karbon, azot ve hidrojen içeriğinin belirlenmesi için kullanılan bir metottur. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi sırasında şablon molekül olarak kullanılan metoprololün yapısında amin grubundan dolayı azot elementi bulunmaktadır. Şablon molekülün polimer yapısından uzaklaştırılmasıyla yapıda azot gözlenmemesi beklenir. Elementel analiz, polimerin sentezlendikten sonraki azot oranıyla yıkama işleminden sonraki oranını kıyaslamak amacıyla yapıldı. Böylece metoprolole karşı oluşan boşlukların kanıtlanmasına yardımcı oldu.

2.3 Kapiler Kolon Kaplama ve Karakterizasyonu

Kapiler elektrokromatografide durgun fazın iki önemli rolü vardır; birincisi elektroosmotik akışın oluşması için yüklü bölge oluşturmak, ikincisi ise analitin kolon içinde tutunması için etkileşimli bölgeler yaratmaktır.

Kapiler kolon durgun fazı hazırlanması için genellikle soj-jel sentezi ve organik-inorganik moleküler baskılanmış polimerler kullanılır. Polimerik yöntem analite karşı bir seçiciliğe sahip olduğu için önemli bir avantaja sahiptir (Wackerling vd. 2016).

2.3.1 Sol-jel Yöntemi ile Kapiler Kolon Kaplama

Bu bölüm amin modifiye, fenil modifiye, amin-fenil modifiye ve modifiye edilmemiş silikatları içermektedir (Tablo 19). Sıcak sentez prosedürü, kapiler kolona daha kolay uygulanabilmesi için başka bir prosedür izlenerek (Wu vd., 2006) soğuk senteze dönüştürüldü. Bu bağlamda silika nanopartiküller, ekstra ısı işlemi gerektiren modifikasyon adımları olmaksızın fonksiyonellendirildi ve çalışma boyunca soğuk sentez olarak adlandırıldı.

Soğuk sentezde, 0.638 mL $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.8 mL deiyonize su ve 17.6 mL EtOH içeren alkoksit çözeltisine 2.79 mL TEOS ve 22.2 mL EtOH eklendi. Oda sıcaklığında 3.5 saat karıştırıldıktan sonra, sentezlenmek istenen sorbentin özelliğine göre 4.79×10^{-4} mol TPES veya 3-APTES ilave edildi. Sol-jel prosedüründe ise reaksiyona giren maddeler 165.0 mL EtOH, 3.0 mL TEOS, 21 mL deiyonize su ve 3.15 mL $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ şeklinde optimize edildi.

Tablo 19. Silikat ve fonksiyonlaştırılmış silikat ile yeni kolon sentezi

Kod	Prosedür	Reaksiyon başlangıç noktası	Doldurma işlemi	Katman sayısı
S1	Sol-jel	Kolon içinde	CE sistemi ile	x
S2	Soğuk sentez	Kolon içinde	CE sistemi ile	x
S3	Soğuk sentez	Kolon dışında	CE sistemi ile	x
S4	Soğuk sentez	Kolon içinde	CE sistemi ile	3
S5	Soğuk sentez	Kolon içinde	CE sistemi ile	5

2.3.2 Moleküler Baskılama ile Kapiler Kolon Kaplama

Bu bölümde kolon kaplamak için moleküler baskılanmış malzemeler kullanıldı. MIP-NIP ve MIIP-NIIP ile hazırlanan kolonların prosedürleri, reaksiyon başlangıç noktaları, doldurma işlemi ve katman sayısı Tablo 20’de gösterilmektedir. Projede önerilen yekpare ve açık tübümsü kolonların geliştirilmesi için erimiş (fused) silika kapiler kolonların iç duvarlarını aktif hale getirmek gerekir. Bu amaçla, kapiler kolon duvarında silanol gruplarının ayrışarak yüzeyin negatif yüklenmesi için kapiler kolon (30 cm 75 µm-id) şartlandırıldı. Daha sonraki aşamada kolona polimerin tutunması amacıyla bağlayıcı olarak görev yapan (trimetoksisilil) propil metakrilat kolondan geçirilerek polimerin kapiler kolon duvarına bağlanması için alanlar yaratıldı. Bu prosedür Hijerten (1985) tarafından önerilen parametrelerle gerçekleştirildi. 1.0 mL 0.006 mM asetik asit çözeltisi hazırlanıp, çözeltinin içine 4.0 µL (trimetoksisilil) propil metakrilat eklenerek kapiler kolondan geçirildi ve bir saat boyunca kolon bekletildi. Bölüm 2.1’de anlatıldığı gibi hazırlanan MIP200 polimer karışımı kapiler elektroforez cihazının giriş kısmına bir flakonun içinde konuldu ve basınç (3.0 bar) uygulanarak kapiler kolondan geçirildi. Cihazın kaset sıcaklığı 60°C’ye ayarlandı ve çözeltinin polimerleşmesi cihaza takılı kolon içinde gerçekleştirildi. Son olarak MeOH:deionize su (pH 3.0) (9:1) çözeltisi kolondan geçirilerek kolon içinde reaksiyona girmemiş bileşenler ortamdaki uzaklaştırıldı. Absorbans ölçümleri için kapiler kolonun bir ucundan 8.5 cm hesaplanarak üzerindeki polimer koruyucu tabaka soyuldu. MIP200 haricindeki kolonlarda, kolon içinde başlatılan reaksiyonların sonuçları (özellikle MIP ve NIP için) yüzeye tutunma açısından tatmin edici olmadığı için MIIP ve NIIP dolguları kolon dışında başlatılan reaksiyonlar ile devam ettirildi.

Kapiler kolon hazırlamada farklı bir yöntem de denendi. Hazırlanan polimer çözeltisi CE cihazının enjeksiyon sistemi kullanılarak kolondan geçirildi ve kolonun içinin polimer çözeltisi ile dolması sağlandı. Daha sonra cihazdan çıkarılan kolon, fotopolimerizasyon için UV kaynağı (350 nm) altında 45 dakika boyunca 87 rpm’de döndürülerek bırakıldı ve kolon içinde

Tablo 20. MIP/NIP ve MIIP/NIIP ile Yeni Kolon Sentezi

Kod	Prosedür	Reaksiyon başlangıç noktası	Doldurma işlemi	Katman sayısı
NIIP1	Silika bazlı NIIP	Kolon içinde	CE sistemi ile	x
NIP1	Polimer bazlı NIP	Kolon içinde	CE sistemi ile	x
NIP1.1	Polimer bazlı NIP	Kolon içinde	CE sistemi ile	1
NIP1.1.1	Polimer bazlı NIP	Kolon içinde	CE sistemi ile	2
MIP2	Polimer bazlı MIP	Kolon dışında	Şırınga ile	x
NIP2	Polimer bazlı NIP	Kolon dışında	Şırınga ile	x
MIP3	Polimer bazlı MIP	Kolon dışında	CE sistemi ile	3
NIP3	Polimer bazlı NIP	Kolon dışında	CE sistemi ile	3
NIP3.1	Polimer bazlı NIP	Kolon dışında	CE sistemi ile	5
MIP200	Polimer bazlı MIP	Kolon dışında	Şırınga ile	x
MIP200.3	Polimer bazlı MIP	Kolon dışında	CE sistemi ile	3
MIP200	Polimer bazlı MIP	Kolon içinde	UV kaynağı ile	1

polimerleşme başlatıldı. Kolonun dedeksiyon gözünde polimerleşme olasılığını azaltmak için göz kısmı alüminyum folyo ile kapatıldı. UV kaynağından alınan kolon CE cihazının kaset kısmına sabitlendi ve 10 dakika boyunca içinden asetonitril geçirilerek reaksiyona girmemiş moleküllerin akması sağlandı. Bir saat süreyle kurutulan kolondan yine bir saat boyunca MeOH:asetik asit (9:1) karışımı geçirildi ve bu sayede şablon molekül (metoprolol) uzaklaştırılarak seçici boşluklar oluşturuldu. Performans testi için, deiyonize su içinde hazırlanan 50.0 mg/L ve 100.0 mg/L metoprolol ve atenolol karışımı kolondan geçirildi. Elektrolit çözeltisi olarak 10.0 mM borat tamponu (pH 9.5) kullanıldı.

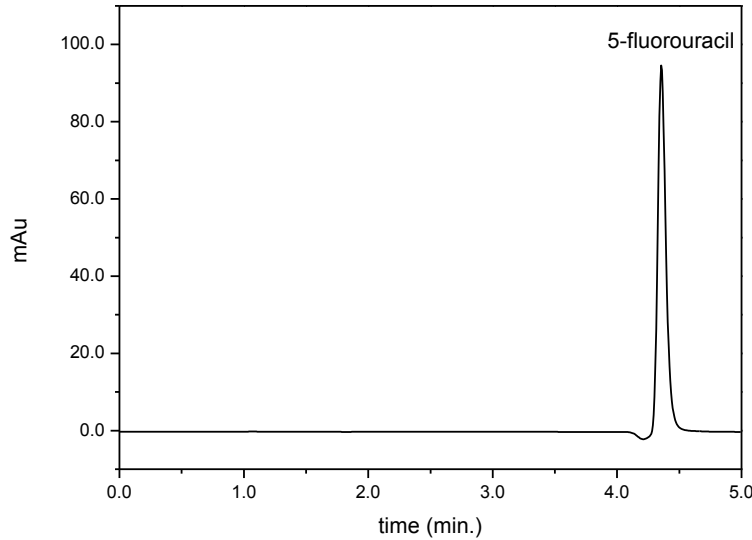
BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri

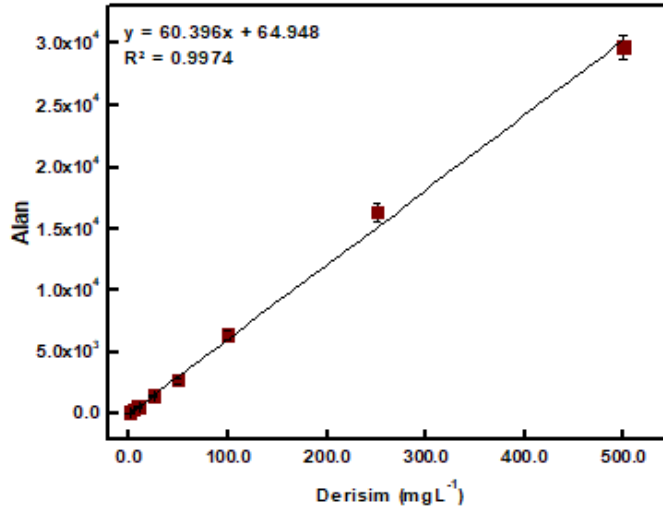
3.1.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları

Sabit faz olarak C18 kolonu (Supelco C18, 250 mm x 4.6 mm) ile yapılan çalışmalarda ve uygulanan deney koşullarında 5-florourasil, 5-azasitidin ve gemsitabin birbirlerinden ayrılmadı. Bu nedenle C18'e ek olarak C30 kolonu da kullanıldı. Ancak gemsitabinin hem maliyeti hem de tedarik süresinin uzunluğu nedeniyle çalışmalardan çıkarılmasına karar verildi. Anti-kanser ilaç etken maddeleri için kullanılan çalışma koşulları ve kalibrasyonda kullanılan çözelti derişimleri Tablo 3'de verilmektedir. HPLC'de 5-FU analizi için C30 kolonu tercih edildi. Mobil faz olarak 10 % asetonitril – 90 % su (pH 5.0) kullanıldı. En iyi ayırım için farklı akış hızları denendi ve 0.8 mL/min akış hızı ve 30.0 °C kolon sıcaklığında deney yapılmasına karar verildi. Şekil 21'de 10.0 mg/L 5-FU'ya ait kromatogram verilmektedir.



Şekil 21. 10.0 mg/L 5-FU'ya ait kromatogram (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 10:90 asetonitril:su (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm)

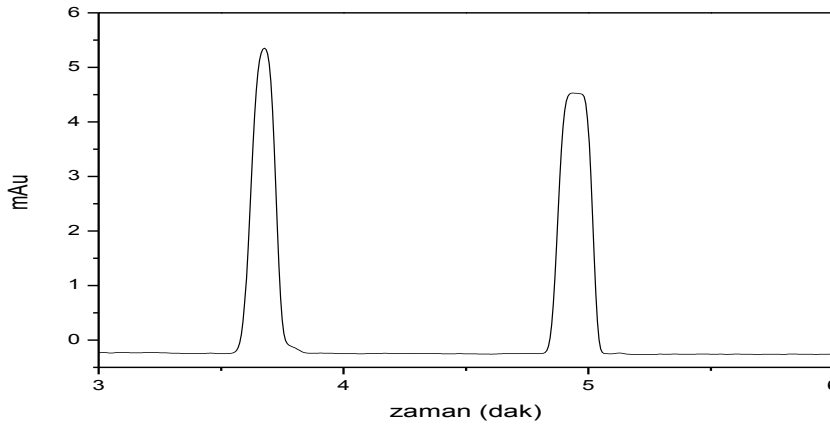
Şekil 22'de 5-FU'ya ait kalibrasyon grafiği verilmektedir. Tayin limiti (LOD) ve kantitatif ölçüm sınırı (LOQ) sırasıyla 0.73 ve 2.4 mg/L olarak hesaplanmıştır.



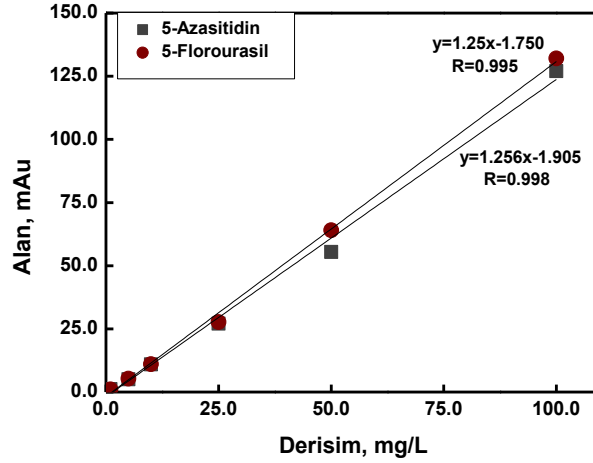
Şekil 22. 5-FU için kalibrasyon grafiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 10:90 asetonitril:su (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3).

3.1.2 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları

Şekil 23'de 10.0 mM'lık borat tampon çözeltisinde hazırlanan analitlerin elektroferogramı gösterilmektedir. Sonuç olarak, CE-DAD çalışmalarında 5-florourasil ve 5-azasitidin piklerinin ayrılması için dalgaboyu, pH ve derişim değerleri sırasıyla 234 nm, pH 11.5 ve 10.0 mM borat tamponu olarak, enjeksiyon basıncı ve zaman aralığı ise sırasıyla 50.0 mbar ve 5.0 s olarak belirlendi. Bu veriler doğrultusunda 5-florourasil ve 5-azasitidin için CE-DAD kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 24). LOD ve LOQ değerleri, 5-florourasil için sırasıyla 0.188 ve 0.63 mg/L, 5-azasitidin için sırasıyla 0.177 ve 0.590 mg/L olarak hesaplandı.



Şekil 23. 5-florourasil ve 5-azasitidin karışımının 10.0 mM borat tamponundaki elektroferogramı. (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, analit derişimi: 20.0 mg/L, pH: 11.5, dalgaboyu: 234 nm, voltaj: 20 kV)

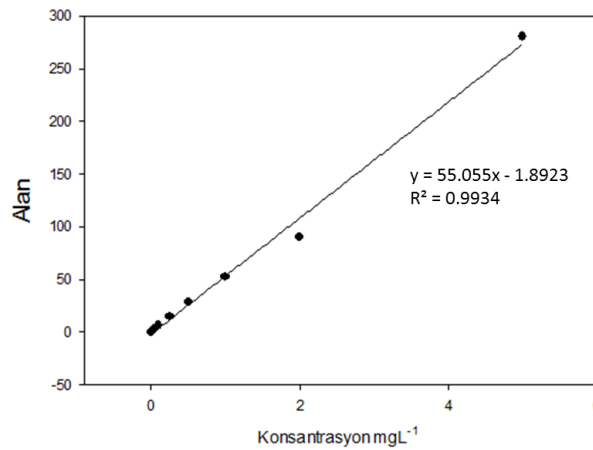


Şekil 24. 5-florourasil ve 5-azasitidin karışımının CE-DAD kalibrasyon grafiği (Agilent 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, borat tampon derişimi: 10.0 mM, analit derişimi: 20.0 mg/L, pH: 11.5, dalgaboyu: 234 nm, voltaj: 20 kV)

3.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri

3.2.1 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları

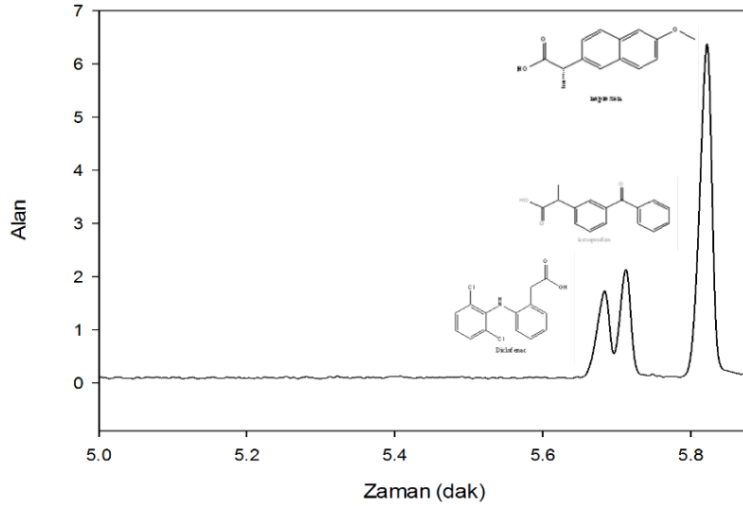
Ağrı kesici ilaç etken maddeleriyle ilgili diğer optimizasyon çalışmalarından sonra diklofenak için kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 25). Nispeten küçük derişimlere (50 µg/L) kadar inildi. LOD ve LOQ hesaplanırken, en küçük okunabilen derişime sahip çözelti 10 kere okutuldu ve değerler sırasıyla 8.27 µg/L ve 27.55 µg/L olarak hesaplandı.



Şekil 25. Diklofenak için kalibrasyon grafiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD Supelco C18, (250 mm x 4.6 mm), 85:15 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 280 nm, n=1)

3.2.2 Ağrı Kesici İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları

Yapılan çalışmalarda en iyi sonuçlar enjeksiyon basıncı ve tarama hızı için sırasıyla 10.0 mbar ve 2.0 Hz olarak belirlense de yeterli ayırım sağlanamadı (Şekil 26). Diklofenak için yapılan MIP çalışmalarında ise 2. raporda belirtildiği üzere MIP ile NIP arasında bir farklılık gözlemlenemedi. Diklofenak çalışmadan çıkarılırken, diğer ağrı kesicilerin sorpsiyon çalışmalarına β -bloker grubu ilaç etken maddeleriyle birlikte devam edildi.

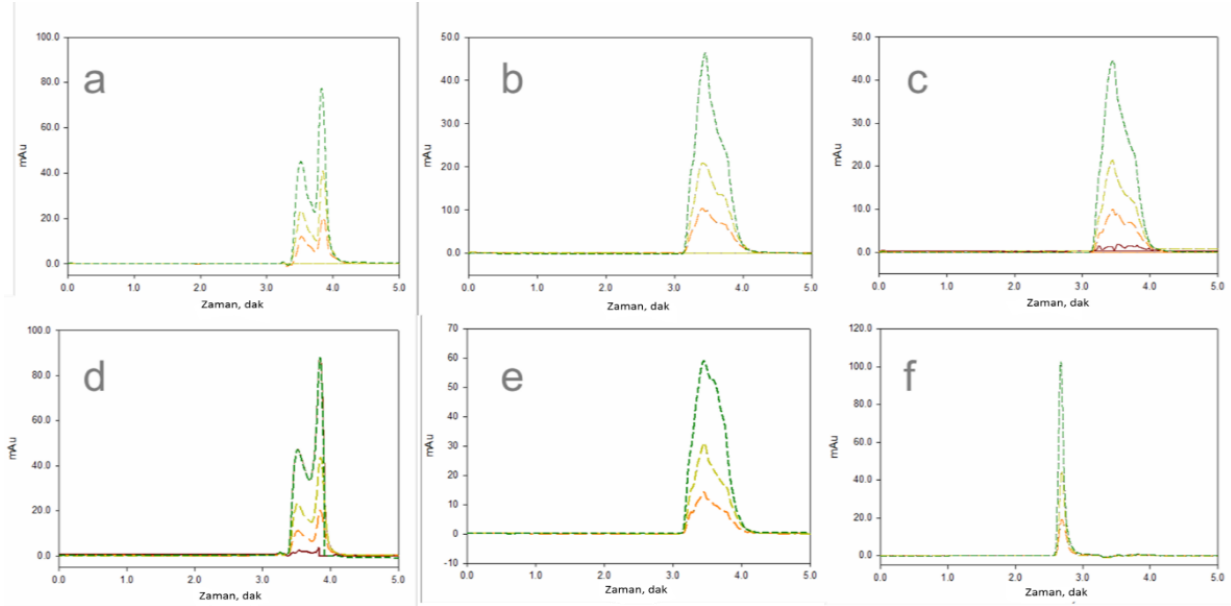


Şekil 26. Ketoprofen, naproksen ve diklofenak için elektroferogram (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, borat tampon derişimi: 10.0 mM, analit derişimi: 20.0 mg/L, pH: 9.0, dalgaboyu: 280 nm, tarama hızı: 2.0 Hz, enjeksiyon süresi: 5.0 s, voltaj: 20 kV).

3.3 Diüretik İlaç Etken Maddeleri

3.3.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları

Denenen çeşitli parametrelerde ayırım yakalanamadığını gösteren kromatogramlar Şekil 27'de verilmektedir. Öncelikle C18 kolonu ve 80:20 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) mobil fazı ile BFT, HCT ve CT kromatografik ayrımları incelendi. Ancak BFT kromatogramında görüleceği üzere istenmeyen omuzlu bir pik trendi saptandı. Ayrıca, HCT ve CT pikleri birbirine benzer şekilde genişledi ve aynı sürelerde geldi. Bu problemi çözmek için mobil faz 80:20 metanol:su (fosfat tamponu, pH 6.0) olarak değiştirildi; ancak, BFT ve HCT pikleri hemen hemen aynı kaldı. İki hareketli faz arasındaki en önemli fark, CT pikinde görüldü ve oldukça keskin ve kromatografik olarak daha kabul edilebilir bir pik elde edildi. Fakat akış hızı değişiklikleri sonuçlara etki etmedi ve herhangi bir gelişme gözlenmedi. HPLC-DAD çalışmaları bu aşamada sona erdirildi ve deneylere CE-DAD çalışmaları ile devam edildi.



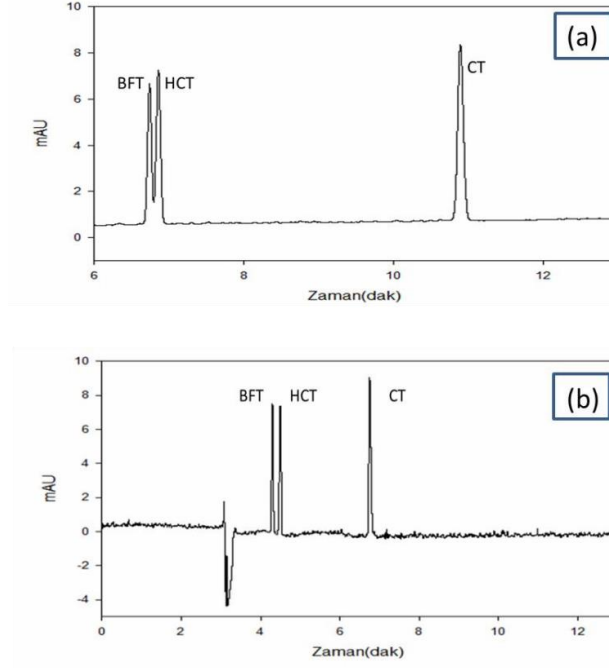
Şekil 27. (a, d) BFT, (b, e) HCT ve (c, f) CT'ye ait kromatogramlar (Agilent 1200 Serisi HPLC-DAD sistemi, Supelco C18 kolon (Lichrosphere RP 18-5, 25 cm × 4.6 mm), (a, b, c) 80:20 metanol:su (asetik asit, pH 3.0) mobil faz, (d, e, f) 80:20 metanol: su (fosfat tamponu, pH 6.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı)

3.3.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları

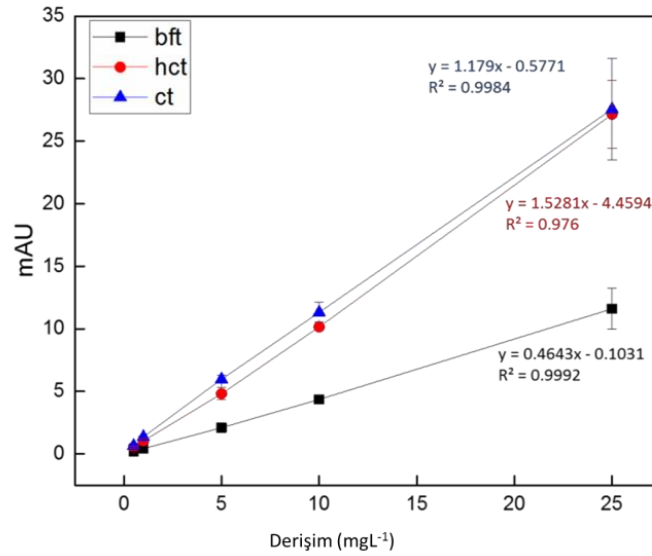
Hidroklortiazid, bendroflumetiazid ve klorotiazid çözeltilerinin derişimleri 20.0 mg/L olarak hazırlandı. Anyonik maddelerin ayrılması için en uygun elektrolit çözeltisi olan borat tamponu (25.0 mM) kullanıldı. Analitler önce CE sistemine ayrı ayrı ve daha sonra bir karışım olarak verildi. Analitlerin elektroferogramına göre; klorotiazid (pKa 6.85) en yüksek, bendroflumetiazid (pKa 8.5) en düşük tutunma süresine sahiptir. HCT (pKa 7.9) ve BFT (pKa 8.5) pikleri arasında, pKa değerlerinin birbirine çok yakın olmasından dolayı, yeterli ayırım sağlanamadı (Şekil 28 (a)). Uygulanan voltaj, enjeksiyon basıncı, enjeksiyon süresi, kaset sıcaklığı değiştirilerek yeni elektroferogramlar elde edildi. Ancak sonuçlar tatmin edici olmadı. Elektrolit çözeltisi fosfat tamponu (pH 7.0) olarak değiştirildiği zaman çözünürlüğün azaldığı gözlemlendi. Böylece, elektrolit çözeltisi borat tamponu olarak seçildi ve derişimi 10.0 mM'ye düşürüldü. Elde edilen elektroferogramda BFT ve HCT piklerinin daha iyi bir ayırım gösterdiği bulundu (Şekil 28 (b)).

Tampon derişimini değiştirmenin elektroosmotik akış hızını oldukça etkilediği gözlemlendi. Bunun en büyük sebebi difüz çift tabakanın kalınlığının değişmesidir. Tampon çözeltisi derişiminin azaltılması pik migrasyon sürelerini kısaltır ve ayırma verimliliğini artırır. Sonuç olarak optimum parametreler; 25 kV voltaj (6.0 W, 300 uA), 10.0 mM borat tamponu (pH 9.4), 50.0 mbar enjeksiyon basıncı (10.0 s), 30.0°C kaset sıcaklığı, 2.5 Hz tarama hızı olarak

belirlendi. Analitlerin kalibrasyon grafikleri Şekil 29’da verilmektedir. LOD değerleri BFT, HCT ve CT için sırasıyla 0.20 mg/L, 0.13 mg/L, 0.30 mg/L; LOQ değerleri yine aynı sırayla 0.69 mg/L, 0.44 mg/L, 0.99 mg/L olarak bulundu.



Şekil 28. (a) 25.0 mM borat tamponu (b) 10.0 mM borat tamponu kullanılarak ayırımı sağlanan analitlerin elektroferogramı

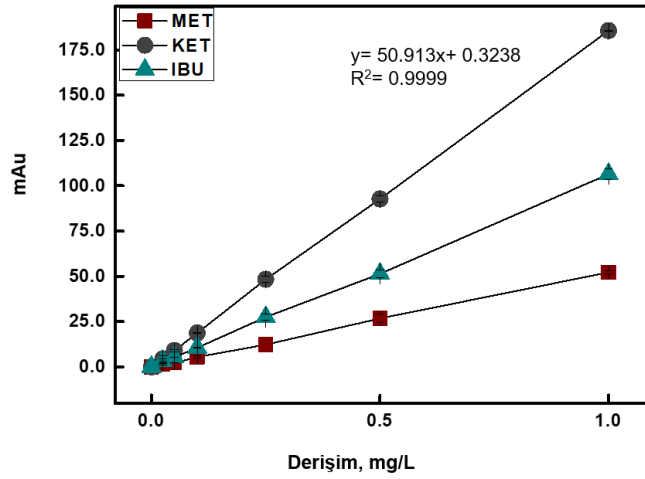


Şekil 29. Bendroflumetiazid, hidroklorotiazid ve klorotiazid için CE-DAD kalibrasyon grafiği

3.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri

3.4.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için HPLC-DAD Çalışmaları

Metoprolol ketoprofen ve ibuprofen için tablodaki optimizasyon parametreleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekli 30'da verilmektedir. Metoprolol için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.036 mg/L ve 0.120 mg/L olarak hesaplandı. Bu değerler metot geliştirme aşaması için yeterli kabul edildi ve ilk aşamalarda bu değerleri geliştirmek için ekstra deney yapılmadı.



Şekil 30. Metoprolol, ketoprofen ve ibuprofen için kalibrasyon grafiği. (Agilent 1200 Series HPLC-DAD system, Supelco C18 kolon (Lichrosphere RP 18-5, 25 cm × 4.6mm), 85:15 MeOH:H₂O (pH 3.0) mobil faz, 0.9 mL/min akış hızı, 220 nm)

3.4.2 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için CE-DAD Çalışmaları

Tablo 21'deki parametreler kullanılarak elde edilen elektroferogramlar Şekil 31'de verilmektedir.

Tablo 21. β -bloker ilaç etken maddeleri için CE-DAD çalışma koşulları

Elektrolit çözeltisi	25.0 mM borat tamponu (NaOH, pH 9.5)
Kolon	Agilent Technologies, FS, (75 μ m id, 57 cm kolon uzunluğu, 50 cm efektif uzunluk)
Kaset sıcaklığı	25.0 °C
Enjeksiyon basıncı ve süresi	50.0 mbar, 5 s
Voltaj, Güç, Akım	20.0 kV, 6.0 W, 300.0 μ A
Tarama hızı	2.5 Hz

Bu çalışmalar kapsamında, kapiler elektroforezde en önemli değişken olan uygun elektrolit çözeltisinin seçimi için; elektrolit derişimi, elektrolit tipi, çalışma parametreleri sistematik olarak değiştirildi ve seçilen β -blokerlerin ayrılması için optimum koşullar belirlendi. Deneylere elektrolit çözeltisinin belirlenmesiyle başlandı. Metoprolol ve atenolol bazik analitler oldukları için, bazik pH sağlayan elektrolit çözeltiler olan borat ve fosfat tamponu seçildi. Fosfat tamponu (pH:7) ile belirgin bir pik gözlemlenemedi ve güvenilir bir şekilde pH 8.0'in üzerinde elektrolit çözeltisi hazırlamak mümkün olmadı. İkinci olarak borat tamponu (pH:9.5) denendi ve anlamlı analit pikleri elde edildi.

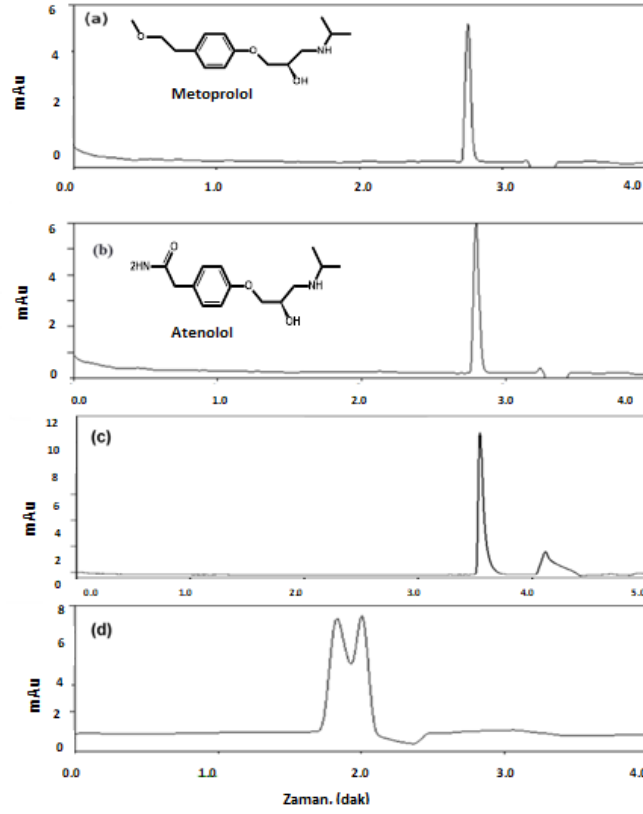
Analitler CE sistemine ayrı ayrı verildikten sonra karışım olarak da verildi. Bunun için 20.0 mg/L atenolol ve metoprolol karışımı hazırlandı ve elektrolit çözeltisi olarak 25.0 mM borat tamponu seçildi. Elde edilen elektroferograma göre, metoprolol (pKa 9.5) ve atenolol (pKa 9.6) arasında pik ayrımı gözlenemedi (Şekil 31c). İki analitin pKa değerlerinin birbirine çok yakın olması ve dolayısıyla polarite farkının olmaması, apolar bir kolonda ayrımın gerçekleşmemesinin ana sebebi olarak değerlendirildi.

İlk olarak elektrolit çözeltisinin derişimi 10.0 mM olarak değiştirildi. Elektrolit çözeltisinin derişimi oluşan elektrik çit katmanının kalınlığını değiştirerek elektroosmotik akışı büyük ölçüde etkiler. Borat tamponunun derişiminin düşürülmesi analitin kolonda kalma süresini kısalttı ve piklerin az da olsa ayrılmasına yol açtı (Şekil 31(d)).

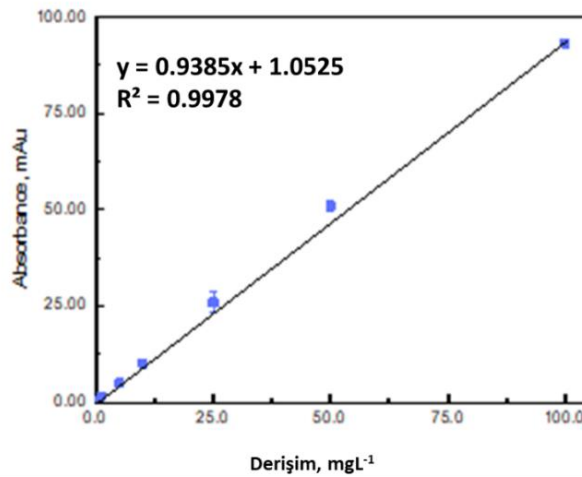
Çalışmaların devamında, tampon çözelti pH'sı, uygulanan voltaj, tarama hızı, enjeksiyon basıncı değiştirilerek yeni elektroferagramlar elde edilse de tatmin edici sonuç alınamadı.

Sonuç olarak optimum parametreler şu şekilde belirlendi; 20.0 kV voltaj (6.0 W, 300 μ A), 10.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 50.0 mbar enjeksiyon basıncı, 5.0 s enjeksiyon süresi, 25.0 °C kaset sıcaklığı, 2.5 Hz tarama hızı.

Metoprolol için oluşturulan CE kalibrasyon grafiğı Şekil 32'de verilmektedir. Metoprolol için LOD ve LOQ sırasıyla 0.22 mg/L ve 0.73 mg/L olarak hesaplandı.



Şekil 31. (a) Metoprolol ve (b) atenololün pH 9.5’de elde edilen elektroferogramı, (c) atenolol ve metoprolol karışımının 25.0 mM pH 9.5 borat tamponu içinde elde edilen elektroferogramı, (d) atenolol ve metoprolol karışımının 10.0 mM pH 9.5 borat tamponu içinde elde edilen elektroferogramı (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent 75 mm FS undeactivated column, analit derişimi: 20.0 mg/L, dalga boyu: 225 nm)



Şekil 32. Metoprolol için kalibrasyon grafiği. Agilent 7100 series CE-DAD sistemi, Agilent Technologies, FS, (75 µm id, 57 cm kapiler uzunluğu, 50 cm efektif uzunluk), 25.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 220 nm)

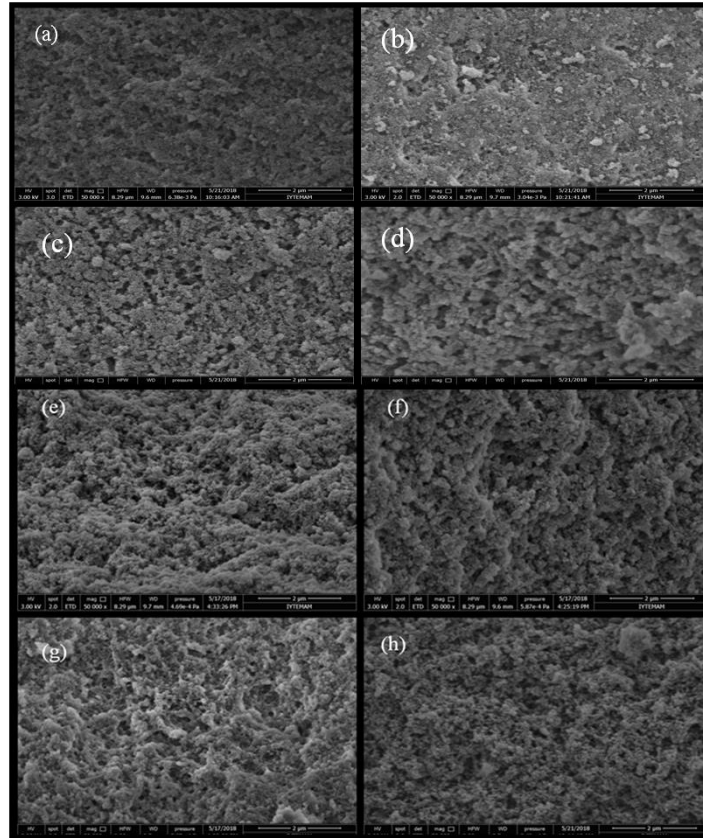
3.5 Kaplama Malzeme Sentezi ve Karakterizasyonu

3.5.1 Anti-kanser İlaç Etken Maddeleri için MIP/NIP Sentezi

3.5.1.1 Monolitik ve Mikro/Nano Kürecik MIP/NIP Karakterizasyonu

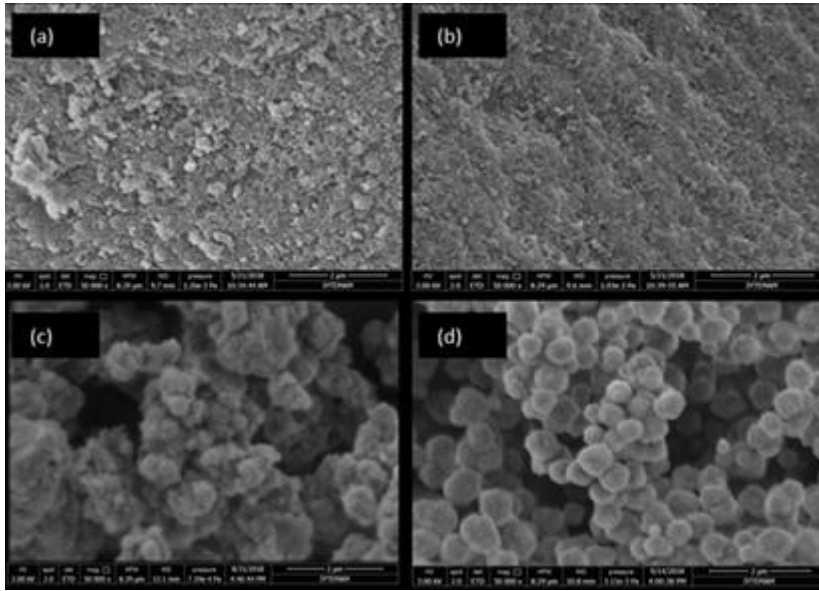
Çalışmanın ilk kısmında, AA-TRIM-DMSO formülasyonları, farklı şablon:monomer:çapraz bağlayıcı molar oranları (1:1:20, 1:4:20, 1:8:20 and 1:8:10) kullanılarak şablon molekülü (5-FU) tanıma kısımları oluşturuldu.

AA fonksiyonel monomeri baskılanmış bağlanma kısımlarıyla bağlanma etkileşiminden sorumludur. AA'nın fonksiyonel monomer olarak seçilmiş olmasının temel nedeni AA'daki temel amin gruplarıyla şablon molekülün etkileşime girmesidir. Sentezlenen 5-FU baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin SEM görüntüleri Şekil 33'de verilmektedir. Yığın polimerleşmesi kullanılarak monolitik polimerleşme elde edildi. Moleküler baskılanmış ve baskılanmamış polimerlerin morfolojileri arasında herhangi bir fark görülmedi.



Şekil 33. NIP/MIP monolitlerinin SEM görüntüleri. (a) NIP (1:1:20 AA), (b) MIP (1:1:20 AA) (c) NIP (1:4:20 AA), (d) MIP (1:4:20 AA), (e) NIP (1:8:20 AA), (f) MIP (1:8:20 AA), (g) NIP (1:8:10 AA), (h) MIP (1:8:10 AA)

Çalışmanın ikinci kısmında, 1:8:20 oranında MAA-TRIM-DMSO polimer formülasyonu kullanılarak şablon molekülü tanıma kısımları elde edilmeye çalışıldı. Toplam monomer/porojen oranı (w/v) polimer morfolojisini kontrol etme imkanı sunmaktadır. Eğer bu oran %5.0'ten küçükse çöktürerek polimerleşme gerçekleşir ve küresel polimer elde edilir. Çalışmanın ikinci kısmında, ilk olarak yığın polimerleşme metodu kullanılarak (%32.5) MIP/NIP polimerler sentezlendi; çöktürme metodu kullanılarak da küresel polimerler elde edildi (% 2.5). Şekil 34 (a) ve (b)'de görüldüğü gibi MIP/NIP monolitik polimer morfolojisinde herhangi bir fark gözlenmedi. MIP mikro-küresel polimer çözeltisi 1:8:10 oranı kullanılarak 40,0 mL asetonitril:metanol karışımında hazırlandı (20:20 v/v) (Şekil 34(c)). Porojen karışımındaki asetonitril oranı artırılarak (180:20 v/v) MIP nano küreleri elde edildi (Şekil 34(d)). Bu çalışmada fonksiyonel monomer ve şablon molekül arasında kovalent olmayan etkileşimler (hidrojen bağı, hidrofobik ve iyonik etkileşimler) kullanılarak baskılama yapıldı. Bu yaklaşım şablon molekül ve monomer kompleksinin kolay hazırlanmasını ve şablon molekülün polimerden kolay bir şekilde geri alınmasına olanak sağlamaktadır.

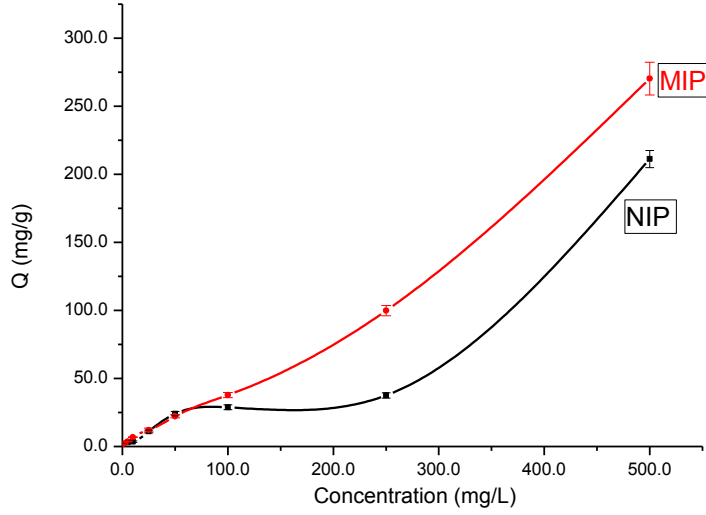


Şekil 34. NIP/MIP monolitlerinin SEM görüntüleri. (a) NIP (1:8:20 MAA), (b) MIP (1:8:20 MAA), (c) MIP (1:8:10 AA, (20:20 v/v)), (d) MIP (1:8:10 AA (20:180 v/v))

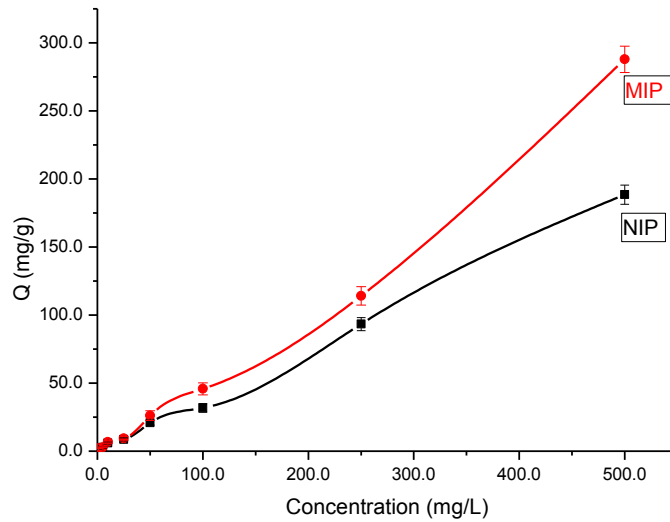
3.5.1.2 Geri Bağlanma Deneyleri

Farklı oranlarda AA-TRIM-DMSO formülasyonları kullanılarak (1:1:20, 1:4:20, 1:8:20 ve 1:8:10) sentezlenen tüm MIP/NIP monolitleri 5-FU sorpsiyon kapasitelerine göre incelendi. Şekil 35, 36, 37 ve 38, 5-FU derişiminin artırılmasıyla, şablon moleküle özgü bağlanma kısımlarına sahip olmasından dolayı MIP monolitinin NIP monolite göre daha iyi sorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

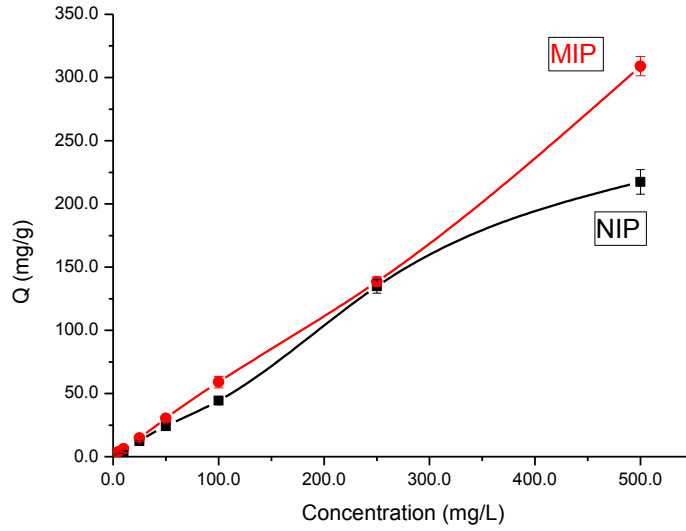
MIP ve NIP monolitleri arasındaki en yüksek bağlanma kapasitesi farkı 1:1:20 sentez formülasyonunda, 250.0 mg/L derişimde elde edildi (Şekil 35). Bu nedenle sonraki aşamalarda SPE sorbenti hazırlanmasında bu oran kullanıldı. Elde edilen bazı sonuçlar beklentilerin dışında seyrettiğinden çeşitli ek deneyler yapılmaktadır.



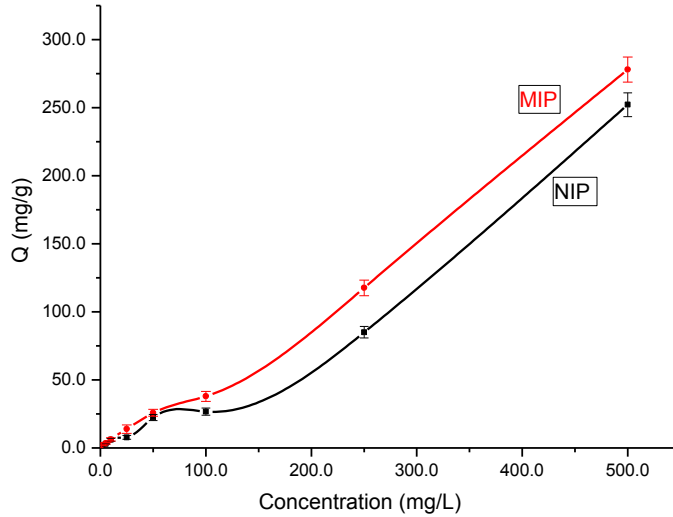
Şekil 35. MIP/NIP monolitlerinin (1:1:20 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)



Şekil 36. MIP/NIP monolitlerinin (1:4:20 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

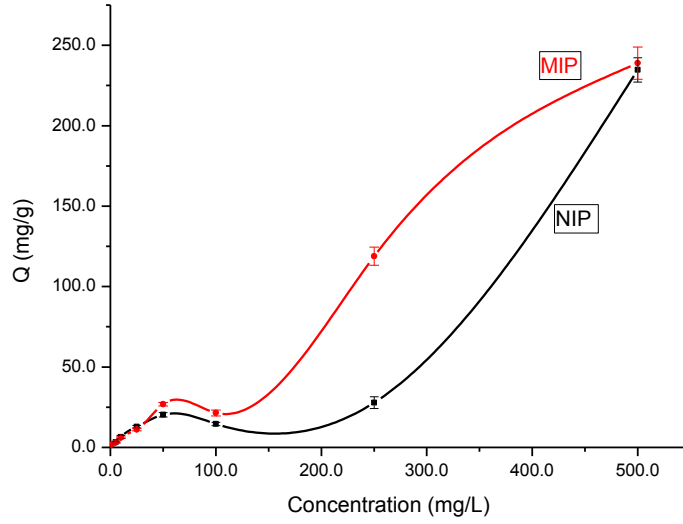


Şekil 37. MIP/NIP monolitlerinin (1:8:20 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)



Şekil 38. MIP/NIP monolitlerinin (1:8:10 AA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

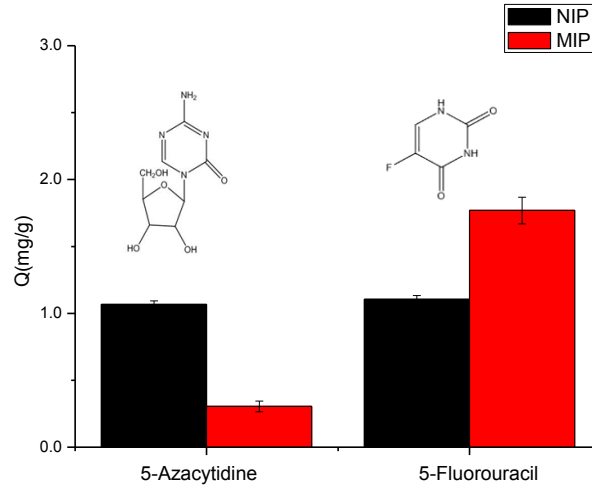
Fonksiyonel monomer MAA ile sentezlenen MIP/NIP monolitleri 5-FU'nun 250.0 mg/L derişiminde en yüksek sorpsiyona ulaştı (Şekil 39). Hatta %-FU derişimi arttıkça NIP sorpsiyonu da artış gösterdi. Bu sonuçların da önümüzdeki deneylerde incelenmesi planlandı. Diğer yandan, MIP/NIP mikro/nano küreleriyle de tekrar bağlanma deneyleri yapıldı; ancak, MIP ve NIP monolitleri arasında herhangi bir fark gözlenmedi.



Şekil 39. MIP/NIP monolitlerinin (1:8:20 MAA) geri bağlanma karakteristiği (Agilent 1200 Series HPLC-DAD, C30 kolon (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

3.5.1.3 Seçicilik Deneyleri

MIP/NIP monolitlerinin antikanser ilacı 5-florourasil ve benzer yapıdaki antikanser ilacı olan 5-azasitidin molekülüne göre sorpsiyon kapasiteleri karşılaştırıldı. Şekil 40'da görüldüğü gibi, 5-FU baskılanmış polimer baskılanmamış polimere göre 5-FU'ya daha iyi sorpsiyon gösterirken 5-AC sorpsiyonu çok daha düşüktü. Bunun sebebi, 5-AC'nin, 5-FU'ya göre daha büyük bir molekül olması ve 5-FU molekülüne özgü boşluklara girememesidir. Diğer taraftan, NIP monolitinin 5-AC ve 5-FU sorpsiyon kapasiteleri arasında herhangi bir fark gözlenmedi. Bu moleküller NIP monoliti yüzeyine spesifik olmayan etkileşimlerle bağlanmış olmalıdır. Bu sonuçlara göre MIP monolitinin 5-FU'ya seçici davrandığı söylenebilir.

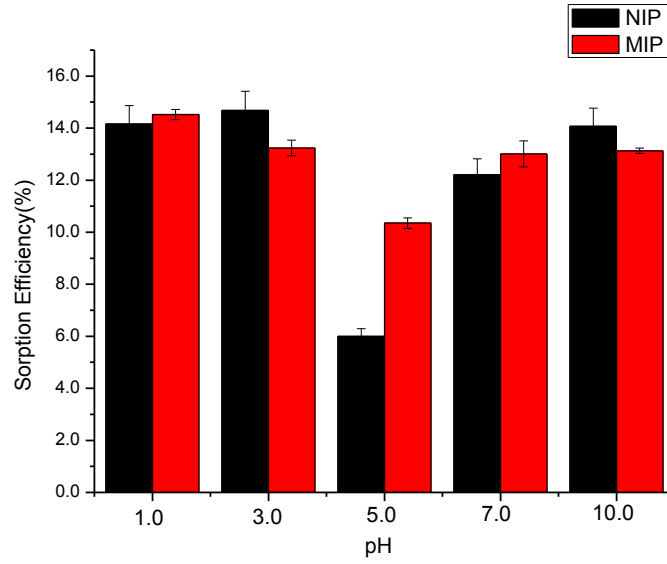


Şekil 40. MIP/NIP monoliti için seçicilik deneyi (1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 kolonu (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 saf su:asetonitril mobil faz 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

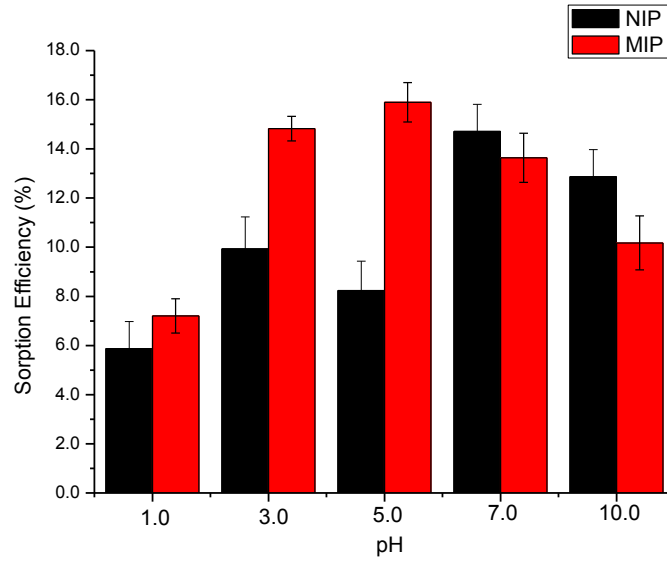
3.5.1.4 Katı Faz Ekstraksiyon ile Kaplama Malzemesi Karakterizasyonu

Çözeltinin pH değeri sorpsiyon verimliliği açısından önemli bir rol oynamaktadır. Polimer matrisindeki amin gruplarının net yükü ve 5-FU aktif bağlanma kısımları pH değişimlerinden etkilenebilmektedir. Sorbentteki amin grupları ve şablon molekül arasında hidrojen bağı yapma eğilimi buna göre belirlenir.

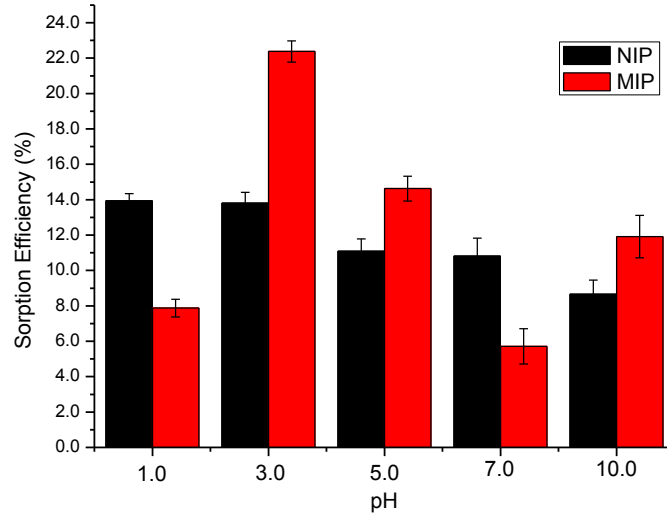
Çözelti pH'sı geniş bir aralıkta değiştirilerek (1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0) MIP/NIP monolitlerinin sorpsiyon özelliklerine etkisi incelendi. Tüm sorbentler pH 1.0 ve pH 10.0 değerlerinde düşük sorpsiyon gösterdi. Bu, 5-FU hidroksil gruplarının asidik ortamda protonlanmasından ve böylece çözünürlüğünün artması sebebiyle şablon molekül ile monomer arasındaki hidrojen bağının etkilenmesinden kaynaklanmış olabilir. pH 10.0'daki sorpsiyonun azalması ortamdaki proton eksikliğiyle açıklanabilir. Şekil 41-45 arasında, farklı sentez oranlarının 5-FU sorpsiyonuna etkisi gösterilmektedir. Sonuçlar, MIP/NIP (1:1:20 AA) ve MIP/NIP'nin (1:4:20 AA) pH 5.0'de, MIP/NIP'nin (1:8:20 AA) pH 3.0'de, MIP/NIP (1:8:10 AA) ve MIP/NIP'nin (1:8:20 MAA) pH 7.0'de seçici sorpsiyona sahip olduğunu göstermektedir.



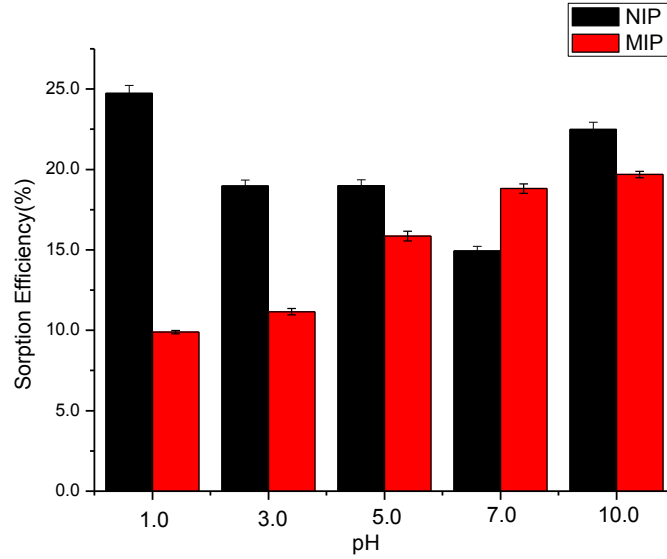
Şekil 41. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)



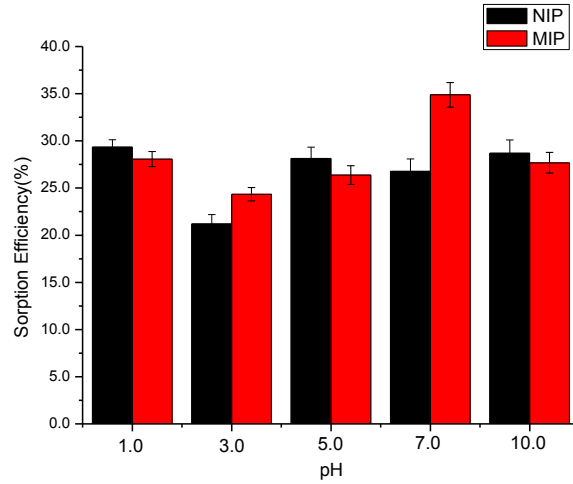
Şekil 42. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:4:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)



Şekil 43. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:8:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

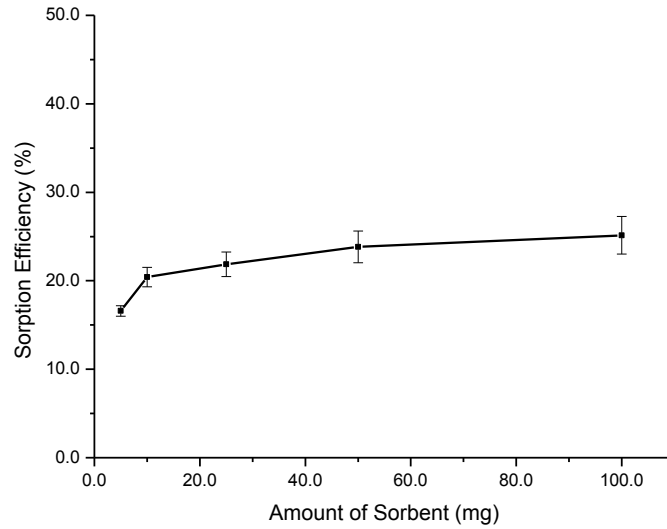


Şekil 44. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:8:10 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)



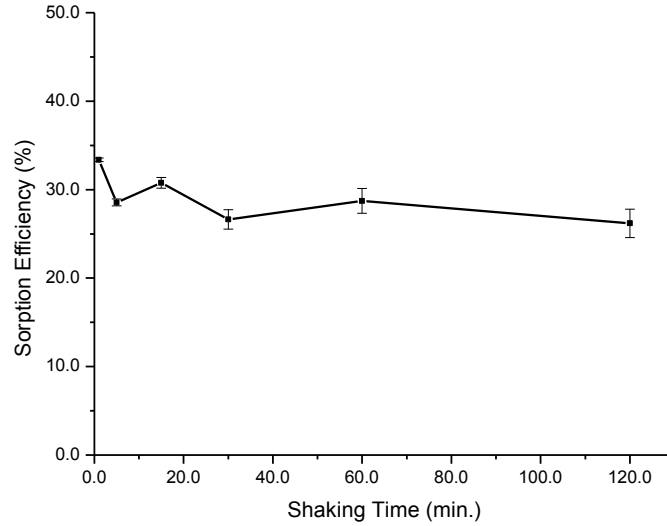
Şekil 45. Çözelti pH'sının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP/NIP, 1:8:20 MAA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

MIP monolit miktarı 5.0 mg-100.0 mg arasında değiştirilerek sorpsiyona etkisi incelendi. Sorpsiyon kapasitesinin sorbent miktarı artışına bağlı olarak az da olsa arttığı gözlemlendi (Şekil 46). En yüksek sorpsiyon 100.0 mg sorbent miktarında elde edildi. Standart sapma değerleri 50.0 mg sorbentin yeterli olabileceğini göstermektedir.



Şekil 46. Sorbent miktarının 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP, 1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

Sorbent miktarı sabit tutularak (100.0 mg) MIP sorpsiyon kapasitesinin çalkalama süresine (1.0, 5.0, 15.0, 30.0, 60.0, 120.0 min) etkisi incelendi. Çalkalama süresi 1.0 dakika olduğunda bile çok yüksek sorpsiyon elde edildi (Şekil 47). Hatta, gereğinden uzun çalkalamanın, tutunmuş analitin çözeltiye geri kaçmasına ve sorpsiyon etkinliğinin düşmesine yol açabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 47. Çalkalama süresinin 5-FU sorpsiyonuna etkisi (MIP, 1:1:20 AA) (Agilent 1200 Series HPLC-DAD (YMC C30 (250 mm x 4.6 mm)), 90:10 su:asetonitril (pH 5.0) mobil faz, 0.8 mL/min akış hızı, 220 nm, n=3)

3.5.2 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

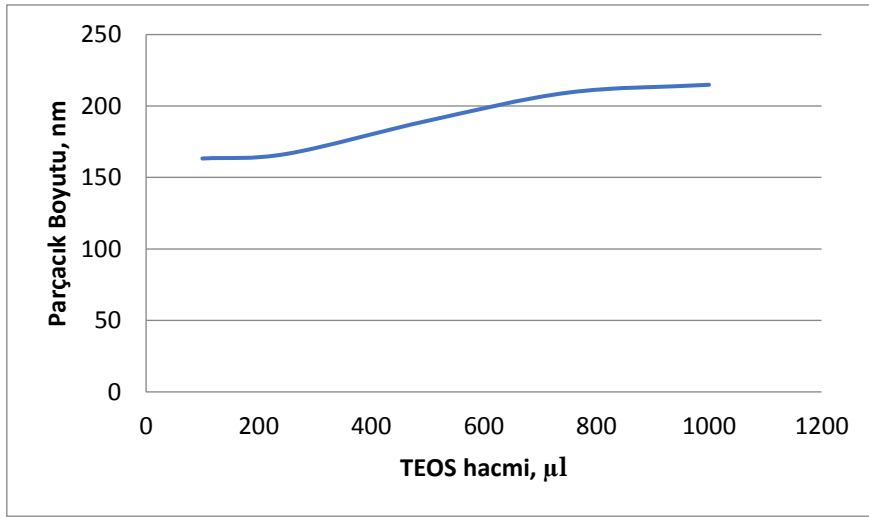
3.5.2.1 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi

Sol-jel yöntemi ile sentezlenen silikatların parçacık boyut kontrolünü sağlamak için yapılan çalışmalarda, bölüm 2.2.2.1'de bahsedilen yöntem ile TEOS ve EtOH miktarının değiştirilmesi üzerine gidildi. Şekil 48 ile 49'da verilen grafikler partikül boyutunun ayarlanması gerektiğinde kullanılacak oranları göstermektedir. Tablo 11'de bulunan 1. deneme için taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü Şekil 50'de gösterilmektedir.

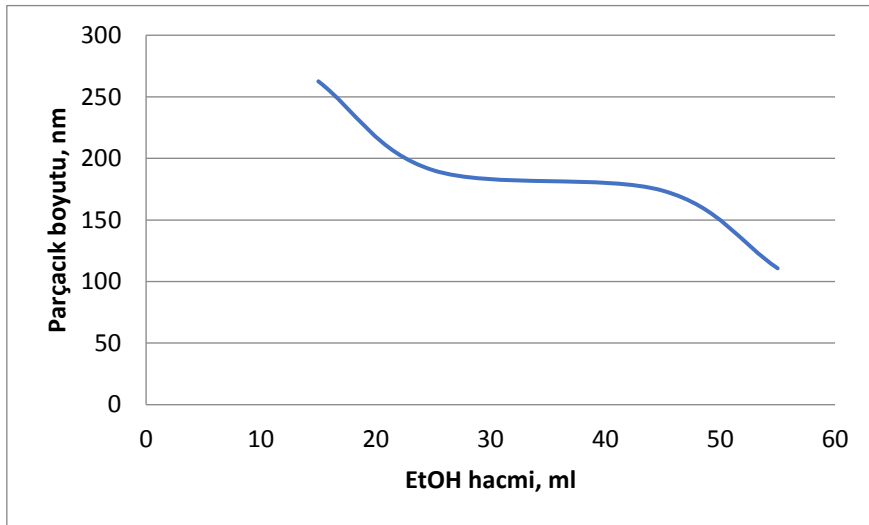
Şekil 48'de görüleceği üzere, TEOS miktarının değiştirilmesi ortalama partikül büyüklüğünde (150-250 nm arasında) önemli bir değişikliğe neden olmasa da üretilen silika jel miktarında değişikliğe sebep oldu.

İkinci bölümde, diğer parametreler sabit tutulurken, EtOH miktarı değiştirildi (Tablo 11). Şekil 49'da görüldüğü üzere solvent miktarının artırılması ortalama partikül çapının küçülmesine neden olmaktadır. İlgili SEM görüntüleri ve partikül boyut dağılımları Şekil 51'de verilmektedir.

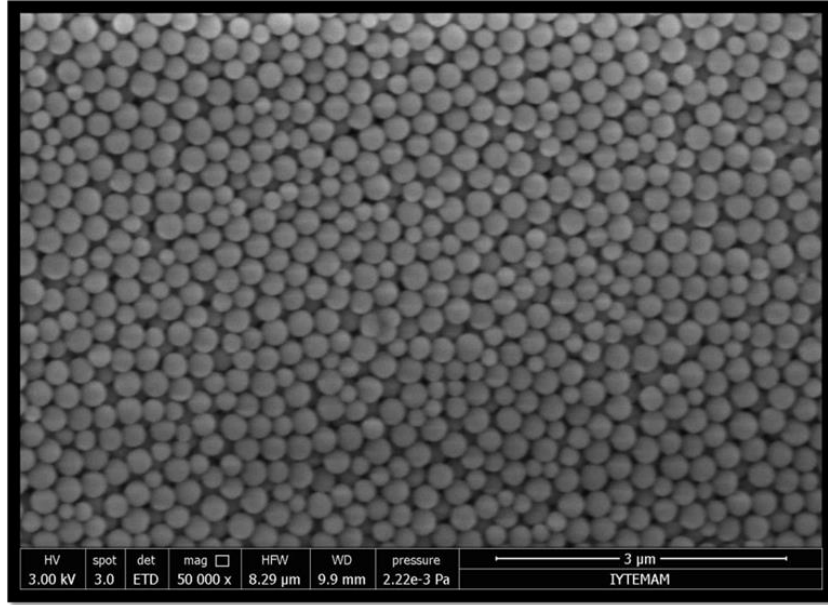
EtOH miktarının artmasıyla partikül boyutunun azalmasının en büyük nedeni parçacıklar arası boşluğun solvent miktarı ile artırılmasıdır. Sol-jel oluşumu sırasında birbirinden uzak olan parçacıklar aglomerasyona uğramadan buldukları konumda büyüme eğilimindedir ve nano-partikül boyutunda kalabilir. Solvent miktarının artırılmasının diğer önemli sonucu, partikül boyut dağılım grafiğindeki daralma, yani daha homojen partikül oluşumudur. Diğer parametreler aynı tutulduğunda, partikül boyutu 15 mL EtOH kullanıldığında 150-450 nm, 25 mL'de 120-400 nm, 45 mL'de 110-340 nm ve 55 mL'de 80-250 nm arasında değişmektedir.



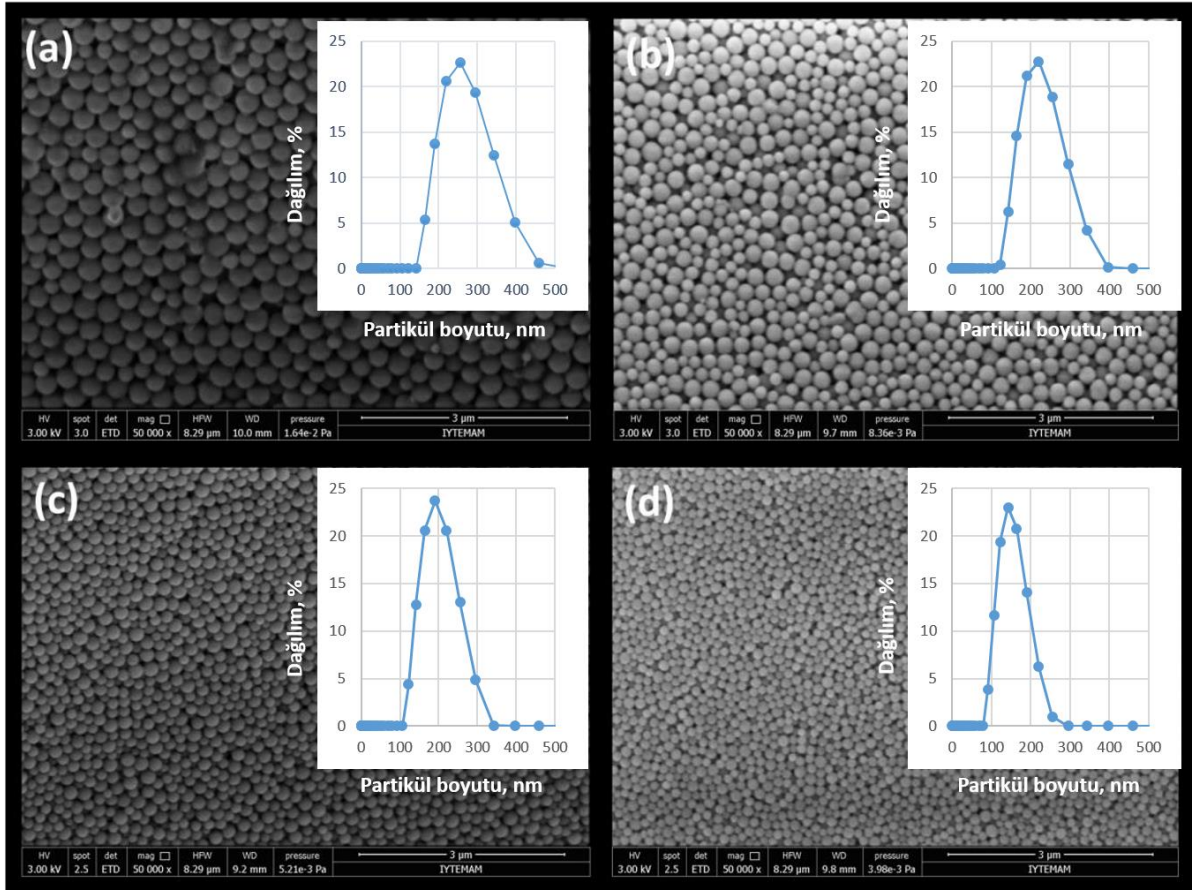
Şekil 48. TEOS hacmindeki değişimin ortalama silika partikül boyutuna etkisi



Şekil 49. EtOH hacmindeki değişimin ortalama silika partikül boyutuna etkisi



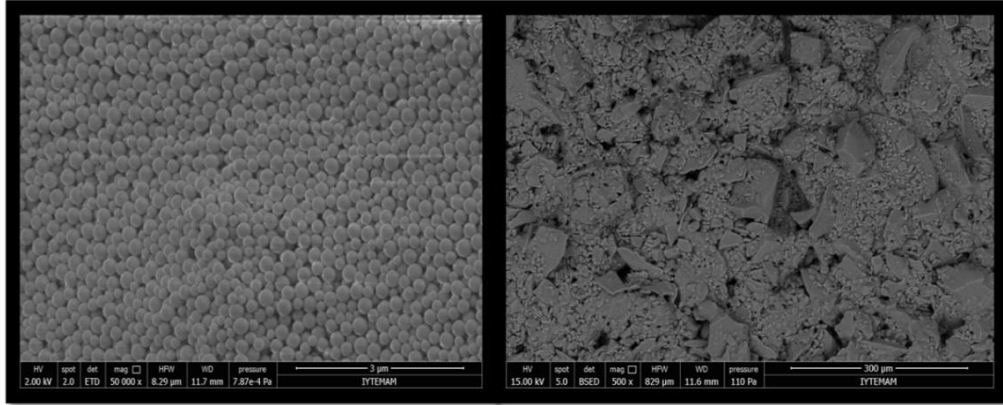
Şekil 50. Silika sol-jel SEM görüntüsü (1 No'lu deney, Tablo 11)



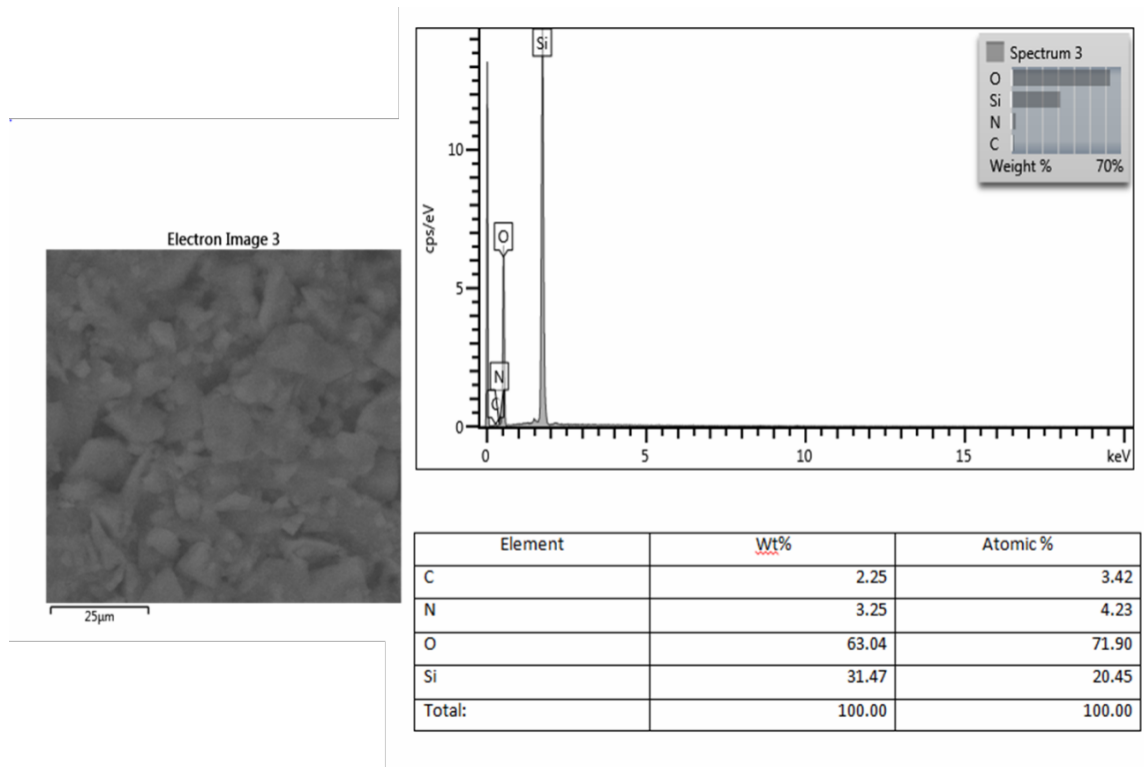
Şekil 51. Sentez prosedüründe farklı EtOH hacimleri ile elde edilen silikatların (Tablo 11) SEM görüntüleri. (a) 15 mL EtOH, (b) 25 mL EtOH, (c) 45 mL EtOH, (d) 55 mL EtOH (İç şekiller partikül boyut dağılımını göstermektedir.)

3.5.2.2 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Silikat Sorbentlerin Yüzey Modifikasyonu

Silikat yapılarının yüzeyinin amin fonksiyonel grupları ile modifiye edildiği örneklerin morfolojisi ve ayrıntılı yüksek çözünürlüklü görüntüleri SEM/EDX kullanılarak incelendi (Şekil 52 ve Şekil 53). Sonuçlar, modifiye yüzeylerdeki yaklaşık amin yüzdesini ve fonksiyonlaştırma işleminin başarısını göstermektedir.



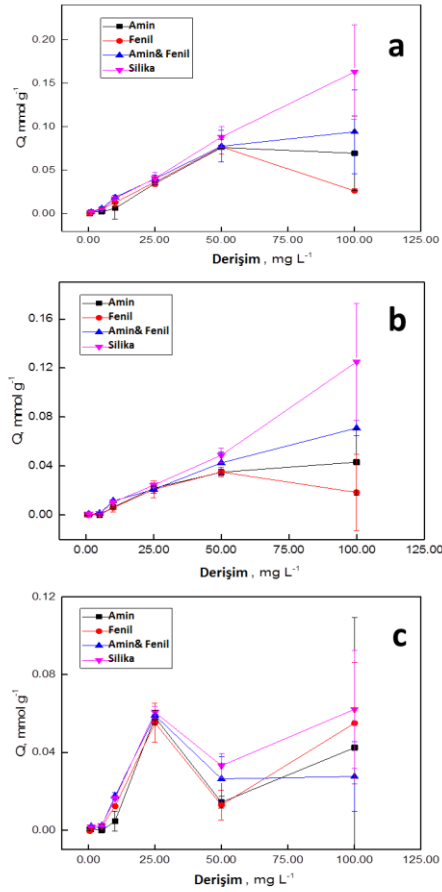
Şekil 52. Amin fonksiyonel grubu ile modifiye edilmiş silikatların SEM görüntüleri



Şekil 53. Amin fonksiyonel grubu ile modifiye edilmiş silikatların EDX sonuçları

3.5.2.3 Sol-jel Sentezi ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu

Amin, fenil ve hem amin hem fenil gruplarıyla aynı anda modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş silika sol-jel partiküllerinin sorpsiyon kapasiteleri Şekil 54'de gösterilmektedir. Şekildeki Q değeri, 1.0 g sorbent üzerinde tutulan analitlerin (mmol) miktarını gösterir. Bu tür sorbentlerde analite seçici bir sorpsiyon beklenmediği için analitler karışım olarak yüklendi. Analitlerin, amin grupları ile modifiye edilmiş silikatlar ile H-bağı oluşturması ve/veya fenil grupları ile modifiye edilmiş silikatlar ile π - π istiflenmesi yapması ve böylece sorpsiyonun artması beklenmekteydi. Ancak, sonuçlar, özellikle 100.0 mg/L analit derişimlerinde çok büyük standart sapma olduğunu, sorbent kapasitesinin bu nispeten yüksek derişim için yeterli olmadığını ve silika yüzeyinin adı geçen fonksiyonel gruplarla modifiye edilmesinin sorpsiyonu artırmadığını, tam tersine düşürdüğünü göstermektedir. Modifiye edilmemiş silikanın daha yüksek sorpsiyon göstermesinin nedeninin, analit molekülleri ile silika yüzeyi arasındaki H-bağı ve elektrostatik çekim kuvveti olabileceği düşünülmektedir.

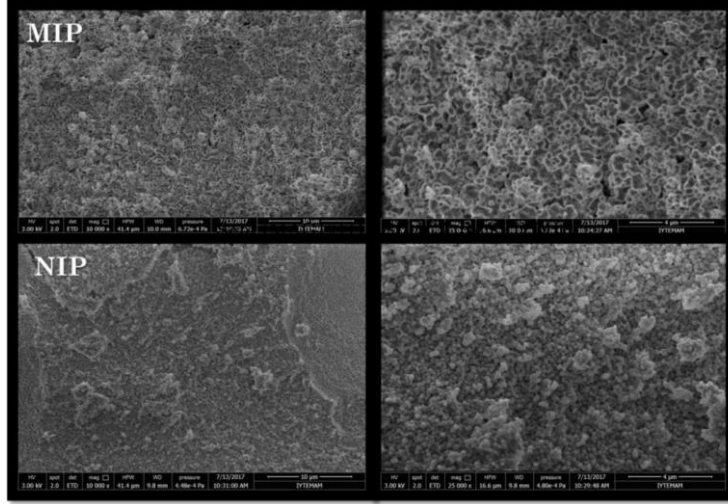


Şekil 54. (a) BFT, (b) HCT, (c) CT için amin ile modifiye edilmiş, fenil ile modifiye edilmiş, hem amin hem fenil ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş silika sol-jel partiküllerinin sorpsiyon kapasiteleri

3.5.2.4 Diüretik İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

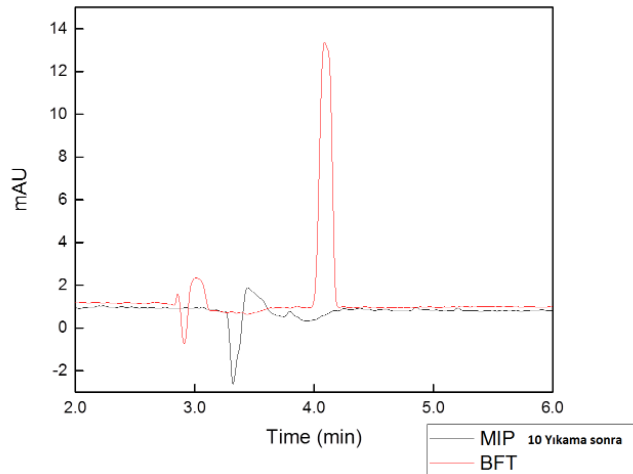
3.5.2.5 Organik Bazlı MIP/NIP Sentezi

MIP ve NIP'ler SEM ile de incelendi (Şekil 55). Olası değişiklikler moleküler düzeyde olacağı için SEM ile takip edilmesi mümkün değildir; sadece morfolojik yapı incelemesi için kullanıldı. Beklendiği gibi MIP'ler ve NIP'lerin morfolojik yapıları arasında belirgin bir fark gözlenmedi.



Şekil 55. MIP ve NIP'lerin SEM görüntüleri

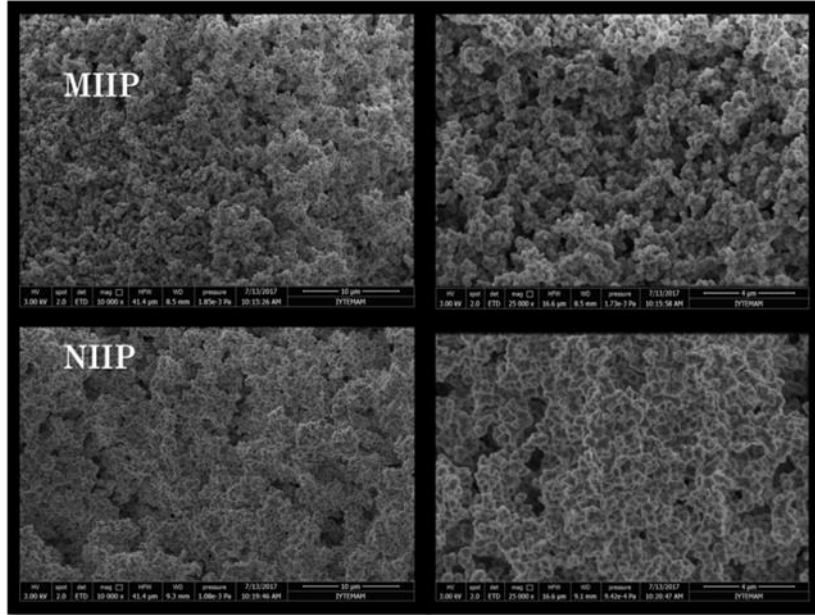
Şablon molekül varlığında sentezlenen polimerler 90:10 MeOH:HOAc (v/v) çözeltisi ile yıkandı ve BFT'nin 10 yıkamadan sonra MIP'den tamamen uzaklaştırıldığı görüldü. BFT'nin MIP'den çıkarılmasından önce ve sonraki elektroferogramı Şekil 56'da verilmektedir.



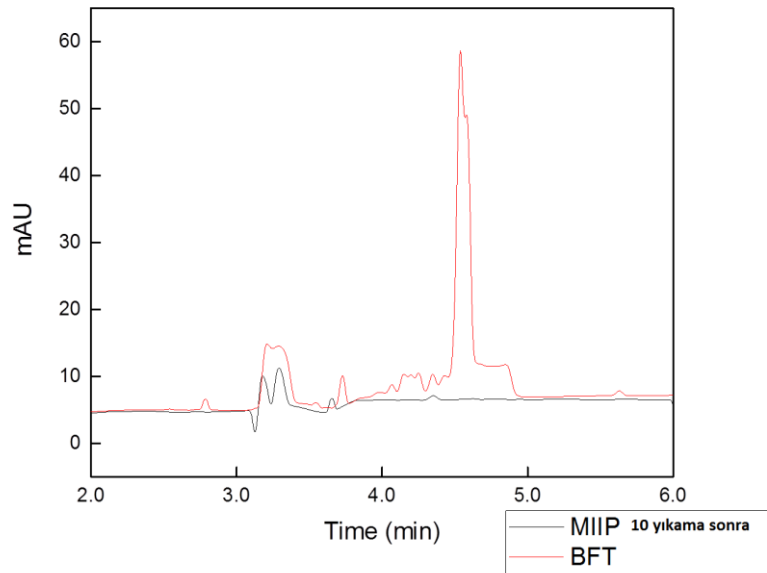
Şekil 56. BFT'nin MIP sorbentinden çıkarılmadan önceki ve sonraki elektroferogramı

3.5.2.6 İnorganik Bazlı MIIP/NIIP Sentezi

MIIP'lerin ve NIIP'lerin yapısal özellikleri SEM ile incelendi (Şekil 57). Yine beklendiği gibi, morfolojik açıdan MIIP'ler ve NIIP'ler arasında belirgin farklılıklar gözlenmedi. Şablon molekül varlığında sentezlenen silika bazlı polimerler 90:10 MeOH:HOAc (v/v) çözeltisi ile yıkandı ve BFT'nin 10 yıkamadan sonra polimerden tamamen uzaklaştırıldığı görüldü. BFT'nin MIIP'den çıkarılmasından önce ve sonraki elektroferogramı Şekil 58'de verilmektedir.



Şekil 57. MIIP ve NIIP'lerin SEM görüntüleri



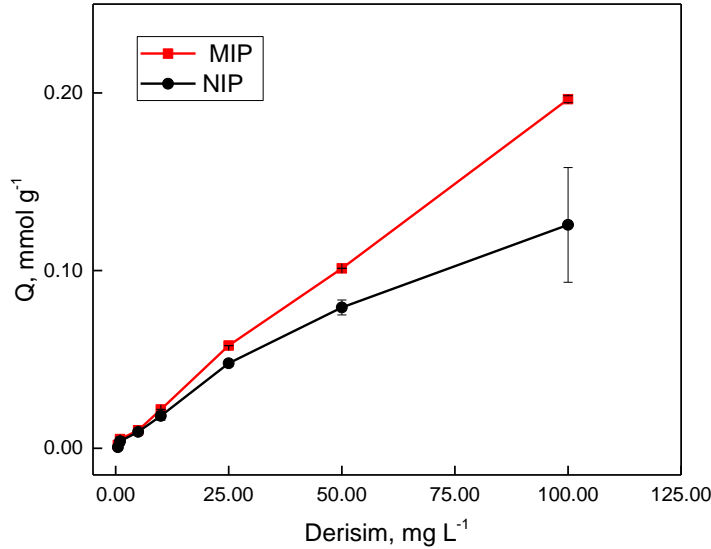
Şekil 58. BFT'nin MIIP sorbentinden çıkarılmadan önceki ve sonraki elektroferogramı

3.5.2.7 Moleküler Baskılama Metodu ile Üretilen Sorbentlerin Karakterizasyonu

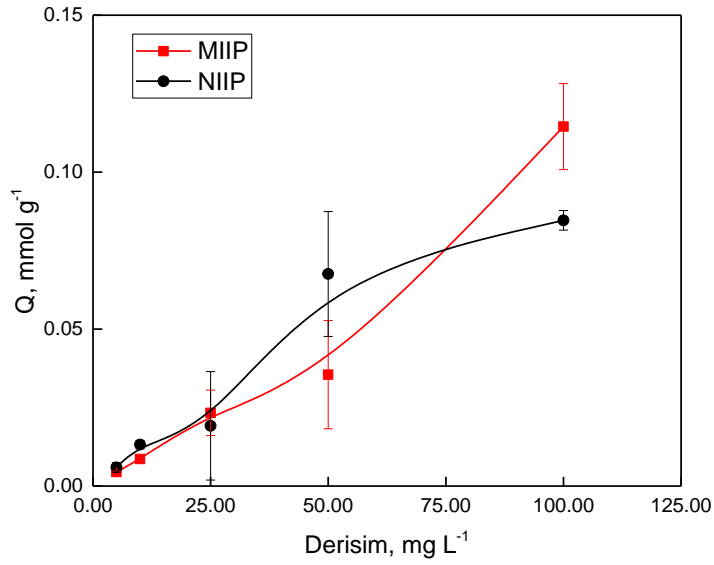
3.5.2.8 Geri Bağlanma Deneyleri

MIP ve NIP partiküllerinin sorpsiyon kapasiteleri Şekil 59'da verilmektedir. Q değeri 1.0 g MIP veya NIP sorbenti üzerinde tutulan analitlerin (mmol) miktarını gösterir. Düşük analit derişimlerinde MIP ve NIP arasındaki sorpsiyon farkı görülmeye başlandı; 25.0 mg/L'den sonra MIP ve NIP sorbentlerinin arasındaki fark iyice belirgin hale geldi. MIP'nin sorpsiyon kapasitesindeki gözlenen doğrusala yakın artış ve analit derişimiyle NIP sorpsiyonu arasında aynı trendin görülmemesi, özel bir şekilde sentezlenen MIP'nin BFT'ye olan seçiciliğinin göstergesidir. Burada behsedilmesi gereken diğer bir husus, özellikle yüksek analit derişimlerinde NIP'nin sorpsiyonundaki standart sapma değerlerinin yüksekliğidir. Bu, NIP'nin seçici sorpsiyon boşluklarına sahip olmadığına diğer bir kanıtı olarak yorumlanmalıdır.

Benzer şekilde, MIIP ve NIIP parçacıklarının sorpsiyon özellikleri ve kapasiteleri de incelendi. Şekil 60'da verilen sonuçlar, MIIP ve NIIP'lerin sorpsiyon kapasiteleri arasındaki farkın tutarlı olmadığına ve standart sapma değerlerinin yüksekliği tekrarlanabilirlikte sorun olduğunun göstergesidir. Bu bağlamda, MIIP ve NIIP'nin, BFT sorpsiyonu için seçici sorbent davranışı göstermediği belirtilebilir.



Şekil 59. MIP ve NIP'nin sorpsiyon kapasitesi

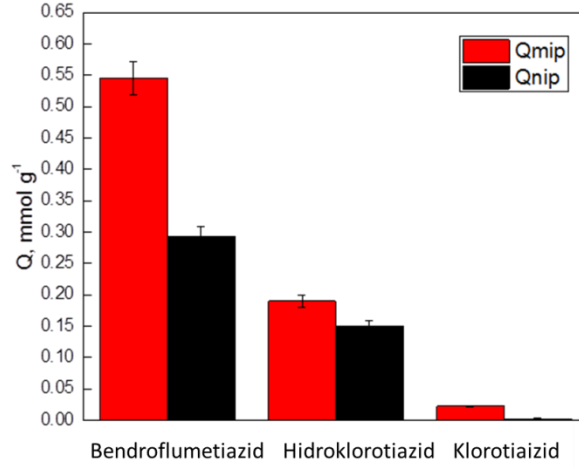


Şekil 60. MIIP ve NIIP'nin sorpsiyon kapasitesi

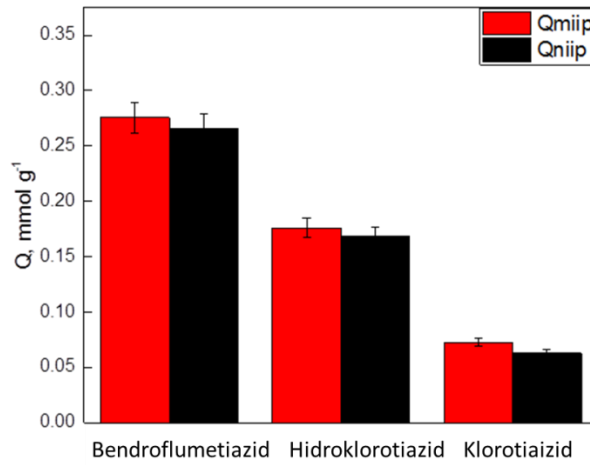
3.5.2.9 Seçicilik Deneyleri

Yapısal olarak benzer bileşikler kullanılarak yapılan MIP ve NIP sorbentlerinin seçicilik çalışmasının sonucunda elde edilen sorpsiyon kapasiteleri Şekil 61'de verilmektedir. BFT ile yapısal olarak benzer bileşikler olan HCT ve CT'nin varlığında MIP, NIP'den daha yüksek bir sorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bu, MIP'de başarılı bir şekilde üretilen analit (BFT) boşluklarının kanıtıdır. HCT ve CT için, MIP ve NIP neredeyse aynı sorpsiyon özelliğini göstermektedir. Ayrıca, bu iki bileşik için Q değerleri, BFT'ninkine kıyasla daha düşüktür.

HCT ve CT'nin varlığında MIIP ve NIIP, BFT'ye seçici sorpsiyon göstermedi (Şekil 62). Herhangi bir bileşik için MIIP ve NIIP sorpsiyon kapasiteleri arasında belirgin bir fark yoktur. Bu sonuç, sorpsiyonun, sorbentlerin yüzeyindeki etkileşimlere dayalı olduğunu, analit molekülüne özgü boşlukların oluşturulamadığını göstermektedir.



Şekil 61. Yapısal olarak benzer bileşiklerin varlığında MIP ve NIP'nin sorpsiyon kapasitesi

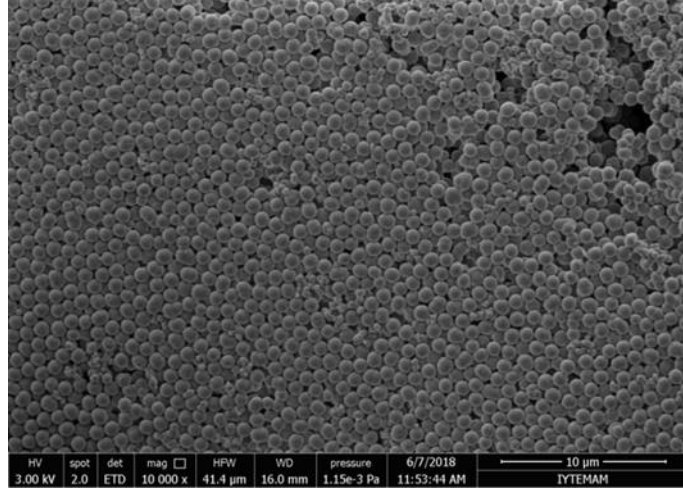


Şekil 62. Yapısal olarak benzer bileşiklerin varlığında MIIP/NIIP'nin sorpsiyon kapasitesi

3.5.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Kaplama Malzemeleri

3.5.3.1 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sol-jel Sentezi

Silika sol jel sentezi sırasında, alkoksit çözeltisi 60.0 mL etanol ve 1000.0 μ L TEOS kullanılarak, katalizör çözeltisi ise 10.0 mL deionize su ve 1.05 mL %26'lık $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kullanılarak hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu iki çözelti karıştırıldı ve jelleşme işlemi gerçekleştirildi. Oluşan silika partiküllerinin SEM görüntüsü Şekil 63'de verilmektedir. Partikül çapı yaklaşık 120 nm'dir.

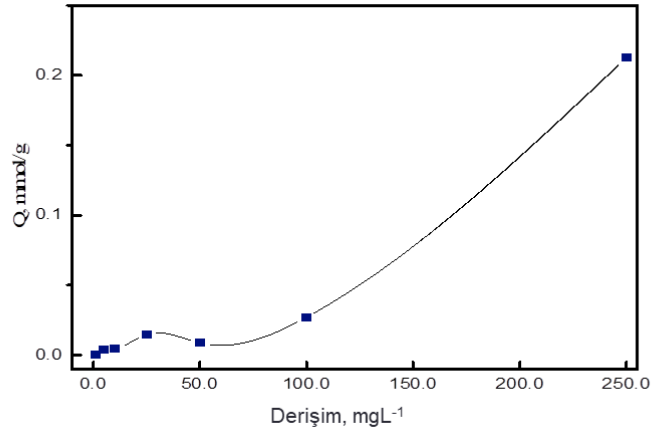


Şekil 63. Sol-jel yöntemiyle sentezlenen silika partiküllerinin SEM görüntüsü

3.5.3.2 Sol-jel Senteziyle Üretilen Sorbentin Karakterizasyonu

Sentezlenen silika nanopartiküllerinin sorpsiyon kapasitesini araştırmak için farklı derişimlerde (1.0 mg/L-250.0 mg/L) hazırlanan 10.0 mL metoprolol çözeltileri 10.0 g silika sorbente eklenerek orbital çalkalayıcıda 24 saat çalkalandı. Sürenin sonunda sorbentler membran filtrasyon düzeneği kullanılarak süzöldü ve filtrattaki metoprolol miktarı CE-DAD ile belirlendi.

Silika nanopartiküllerin yüzeyi herhangi bir fonksiyonel grupla modifiye edilmediği için metoprolole özgü seçici alanlara sahip değildir. Bu nedenle, metoprolol sentezlenen silika partiküllere sadece yüzeyden bağlandı. Q değeri 25.0 mg/L ile 100.0 mg/L arasında birbirine yakındır. Derişim 250.0 mg/L'e yükseltildiğinde sorpsiyon da arttı (Şekil 64).



Şekil 64. Silika partiküllerinin sorpsiyon grafiği

3.5.3.3 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için MIP/NIP Sentezi

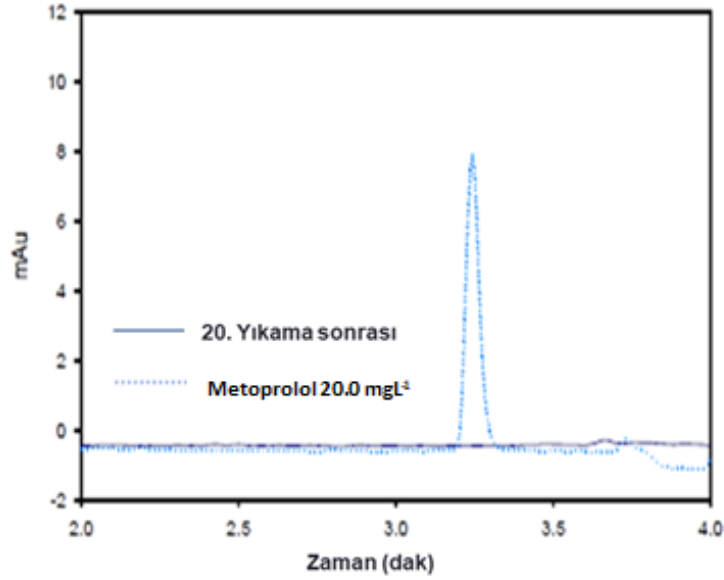
3.5.3.4 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Organik Bazlı MIP/NIP Sentezi

Metoprolol, kalp ilaçlarında en çok kullanılan etken maddelerdendir. Konjestif kalp yetmezliği, hipertansiyon ve anormal kalp ritmi hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Kalp atım hızını düşürdüğü ve el titremesini engellediği için doping maddesi olarak da kullanılan metoprolol Dünya Anti-Doping Ajansının (WADA) yasaklı maddeler listesinde. Kaplama dolgu malzemesi olarak sentezlenen sorbentlerin karakterizasyon çalışmalarından sonra metoprolole karşı seçiciliği en yüksek olan sorbentin kolon dolgu malzemesi olarak kullanılması amaçlandı. Bu amaçla, ilk olarak 2 farklı morfolojiye sahip moleküler baskılanmış polimer sentezlendi. Metoprolol şablon molekül, metakrilik asit (MAA) monomer, trimetilolpropantrimetakrilat (TRIM) çapraz bağlayıcı, 4,4-azobis(4-siyano valerik asit) (AIVN) başlatıcı ve asetonitril çözügen olarak kullanıldı. Sentezden sonra şablon molekül MIP'den uzaklaştırıldı (Şekil 65).

Asetonitril miktarında yapılan değişim, farklı morfolojilere sahip polimerlerin oluşmasına sebep oldu. Sentezlenen polimerlere ait kısaltmalar, kullanılan oranlar ve elde edilen partikül boyutları Tablo 22'de özetlenmektedir.

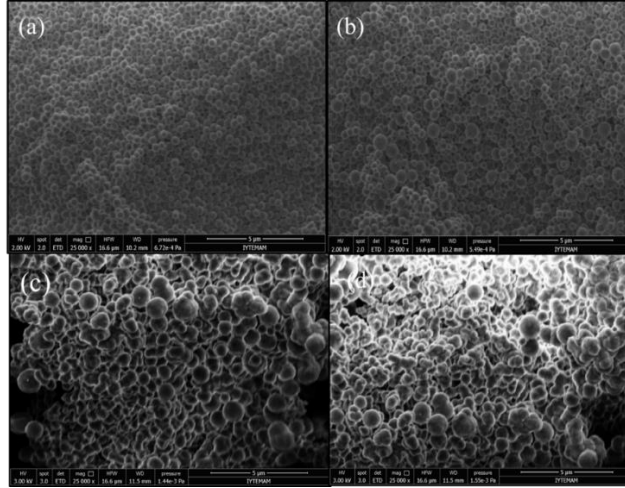
Tablo 22. Metoprolol için MIP/NIP sentez parametreleri

Kısaltma	Açıklama	Metoprolol (mmol)	MAA (mmol)	TRIM (mmol)	AIVN (mmol)	ACN (mL)	Partikül boyutu (μm)
MIP50	Moleküler baskılanmış yekpare polimer	0.5	4.0	20.0	0.48	50.0	x
NIP50	Moleküler baskılanmamış yekpare polimer	0.0	4.0	20.0	0.48	50.0	x
MIP200	Moleküler baskılanmış nano küresel polimer	0.5	4.0	20.0	0.48	200.0	0.400
NIP200	Moleküler baskılanmamış nano küresel polimer	0.0	4.0	20.0	0.48	200.0	0.402



Şekil 65. Metoprolol şablonlu MIP'lerin yıkama öncesi ve sonrası elektroferogramı (Agilent 7100 series CE-DAD sistemi, Agilent Technologies, FS, (75 µm id, 57 cm kapiler uzunluğu, 50 cm efektif uzunluk), 25.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 220 nm)

Seçilen polimerlerin karakterizasyonuna ilk olarak taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) başlandı (Şekil 66). SEM görüntüleri sentezlenen MIP ve NIP'ler arasında morfolojik olarak bir fark göstermedi. Fakat Şekil 66 (a) ve (c) veya (b) ve (d)'deki görüntüler, farklı çözgen miktarlarıyla sentezlenen polimerlerin açık bir şekilde farklı morfolojilere sahip olduğunu göstermektedir. MIP sentezinde monomer ve çözgen oranının morfolojiyi etkilediği bilinmektedir. Çözgen miktarı arttırıldıkça yekpare bir görünümde mikro ve nano boyutta küresel parçacıklara geçilmektedir. Küresel şekilli parçacıkların, şablon molekül için homojen bağlanma alanı sağladığı söylenebilir. MIP200 için monomer:çözgen oranı % 2.08'dir. Bu oran küresel partikül oluşumunu açıklar. MIP50 için ise monomer:çözgen oranı % 8.32'dir. Bu oran da yekpare morfolojiyi dikte eder. Kısaca, çökeltme polimerizasyonu için yeterli çözgen sağlandığında polimer, aglomerasyon yoluyla büyümek yerine küresel partikül şeklini almaktadır.

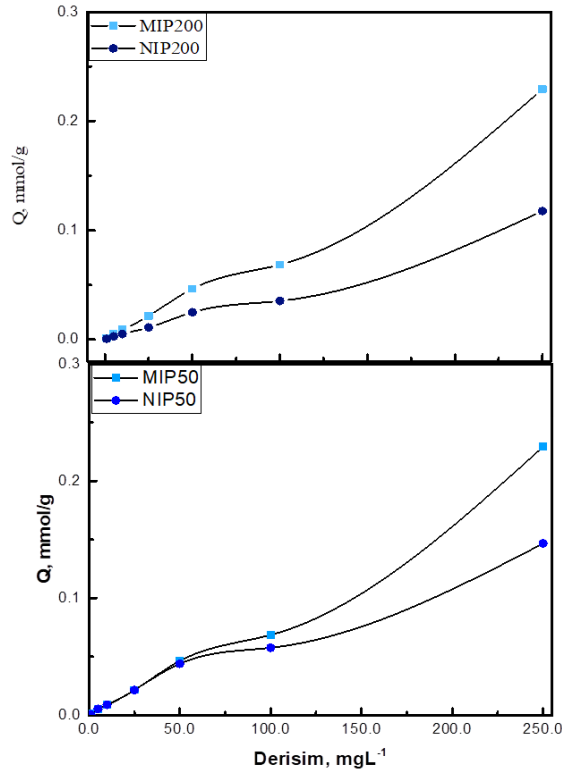


Şekil 66. (a) MIP200, (b) NIP200, (c) MIP50 ve (d) NIP50'nin SEM görüntüleri

3.5.3.5 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sentezlenen Organik Bazlı MIP/NIP'lerin Karakterizasyonu

3.5.3.6 Geri Bağlanma Deneyleri

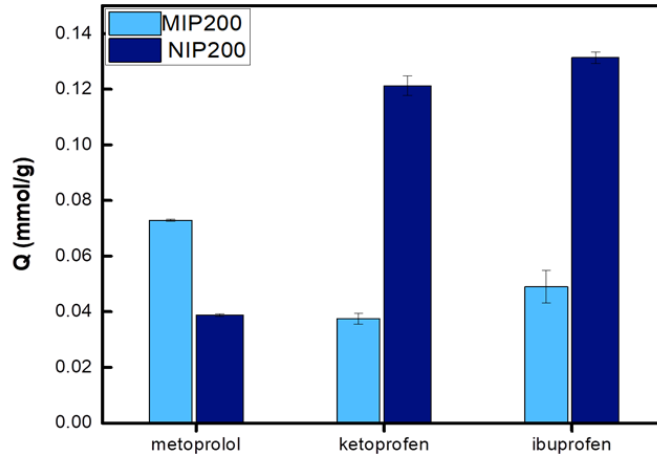
Sentezlenen MIP200 ve MIP50'nin NIP200 ve NIP50'den farkını göstermek için geri bağlanma deneyleri yapıldı. Bu amaçla, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 ve 250.0 mg/L'lik metoprolol çözeltileri hazırlandı ve 10.0 mg sorbent eklendikten sonra orbital karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı. Sürenin sonunda sorbentler membran filtrasyon ile süzüldü ve filtrattaki metoprolol miktarı CE-DAD ile belirlendi. Q değeri (1.0 g MIP veya NIP sorbenti üzerinde tutulan analitlerin (mmol) miktarı) hesaplandı ve grafikler oluşturuldu (Şekil 67). MIP ve NIP arasındaki sorpsiyon farkı, MIP yapısında metoprolole özgü boşluklar oluştuğunu ve NIP'nin daha yüksek sorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. NIP, sadece yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar aracılığıyla metoprololu tutmaktadır. Ayrıca MIP200'ün doyum noktası 50.0 mg/L olarak belirlenirken MIP50 için bu değer 100.0 mg/L'dir. MIP200/NIP200 çifti için sorpsiyondaki farklılaşma düşük metoprolol derişimlerinde başladığı halde, MIP50/NIP50 çifti 50.0 mgL⁻¹ gibi nispeten yüksek bir derişimde bile aynı sorpsiyona sahiptir. Bu nedenle bundan sonraki deneylere MIP200 ile devam edildi.



Şekil 67. (a) MIP200 ve NIP200'ün, (b) MIP50 ve NIP50'nin sorpsiyon grafikleri

3.5.3.7 Seçicilik Deneyleri

Sentezlenen MIP200 ve NIP200'ün metoprolle seçiciliğini göstermek amacıyla farklı ilaç etken maddelerinin (ibuprofen ve ketoprofen) varlığında seçicilik deneyi yapıldı. Bu amaçla derişimi 50.0 mgL⁻¹ olan metoprolol, ketoprofen ve ibuprofen karışımı 10.0 mg MIP200/NIP200 sorbentine eklenip orbital karıştırıcıda 24 saat karıştırıldı. Elde edilen sonuçlar, MIP200'ün metoprolle karşı daha yüksek seçicilik gösterdiğini kanıtladı (Şekil 68). Ketoprofen ve ibuprofen için ise NIP200 daha yüksek sorpsiyon gösterdi. Bu sonuç, ibuprofen ve ketoprofenin MIP200'deki metoprolle özgü boşluklara girememesi ve NIP200'ün yüzeyine tutunmasıyla açıklanabilir.



Şekil 68. MIP200'ün ketoprofen ve ibuprofen varlığında metoprolole seçiciliği

3.5.3.8 Elementel Analiz

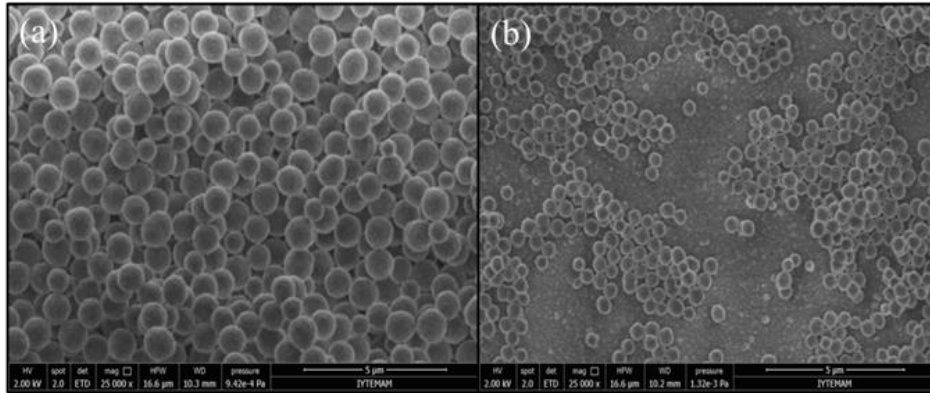
Tablo 23'de görüldüğü üzere, MIP200 ve NIP200 azot içermektedir. NIP200'deki azot (% 0.53) AIVN 4,4-azobis(4-siyano valerik asit) kökenli olmalıdır. Sentezden sonra (yıkamadan önce), MIP200, metoprololde bulunan amin gruplarından kaynaklandığı düşünülen % 0.90 azot yüzdesine sahiptir. Şablon molekülün MIP200'den uzaklaştırılması için yapılan yıkama işleminden sonra, azot içeriği NIP200'deki azot yüzdesine çok yakın bir değer olan %0.54'e düşmektedir. Bu sonuçlar, sentez ve şablon uzaklaştırma/yıkama adımlarının başarısını göstermektedir.

Tablo 23. MIP200/NIP200 için elementel analiz sonuçları

Moleküler baskılanmış (MIP200) ve moleküler baskılanmamış (NIP200) polimerler	Yüzde (w/w)		
	C	H	N
NIP200	60.0	7.4	0.53
MIP200 (metoprolol polimerden uzaklaştırılmadan önce)	59.87	7.7	0.90
MIP200 (metoprolol polimerden uzaklaştırıldıktan sonra)	58.22	7.7	0.54

3.5.3.9 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için İnorganik Bazlı MIIP/NIIP

Metoprolol seçici davranması için sentezlenen diğer bir kaplama malzemesi moleküler baskılanmış inorganik polimerlerdir. Bu amaçla, şablon molekül olarak metoprolol, monomer olarak trietoksifenilsilan (TPES) ve 3-aminopropiltrietoksilan (APTES), çapraz bağlayıcı olarak tetraetoksilan (TEOS) kullanıldı ve kovalent olmayan baskılama yöntemi ile sentez gerçekleştirildi. Bu yaklaşım, şablon molekül ile fonksiyonel monomer arasında hidrojen bağı, hidrofobik ve iyonik etkileşimler kurulmasına bağlıdır. Bu sayede şablon molekülün polimer matriksinden ayrılması kolayca sağlanmaktadır. Sentezlenen MIIP ve NIIP'nin SEM görüntüleri Şekil 69'de verilmektedir. Görüntüler, analit molekül metoprololün MIIP oluşumu sırasında partiküllerin birbirine yakınlaşmasına ve daha homojen bir yapı oluşturmalarına sebep olduğunu düşündürmektedir.

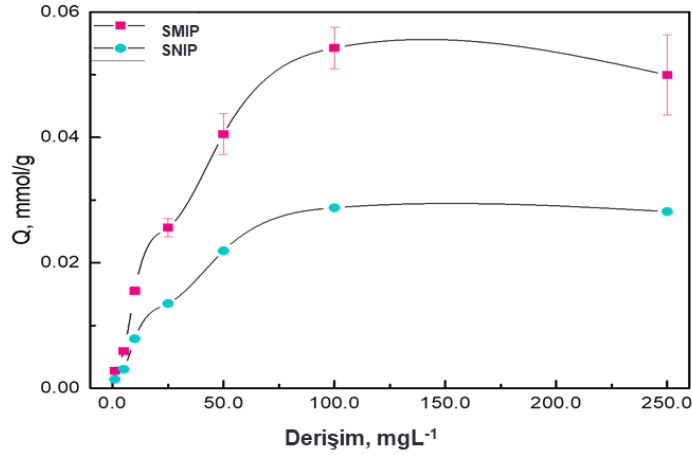


Şekil 69. (a) MIIP, (b) NIIP'nin SEM görüntüleri

3.5.3.10 β -bloker İlaç Etken Maddeleri için Sentezlenen MIIP/NIIP Karakterizasyonu

3.5.3.11 Geri Bağlanma Deneyleri

MIIP ve NIIP sorbentlerinin sorpsiyon kapasiteleri geri bağlanma deneyleri ile araştırıldı. Şekil 70'de görüldüğü gibi MIIP, NIIP'ye göre yüksek sorpsiyon gösterdi. Moleküler baskılanmış inorganik polimerin sorpsiyon kapasitesinin artması polimer matriksindeki metoprololle özgü boşluklar sayesinde. Moleküler baskılanmamış inorganik polimerde seçici boşluklar yoktur.

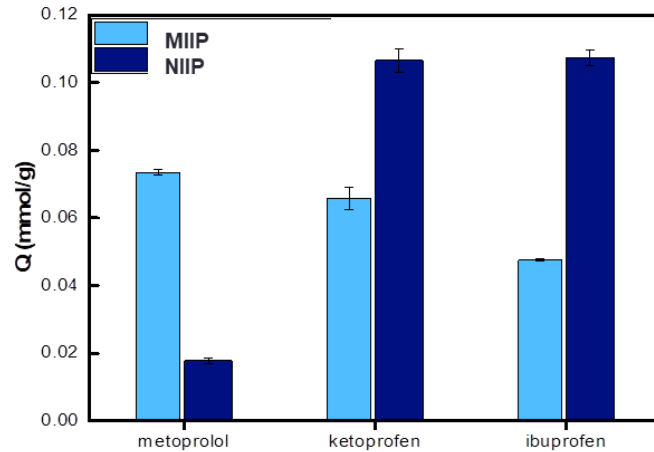


Şekil 70. Metoprolol için geri bağlanma deneyi

3.5.3.12 Seçicilik Deneyleri

Ketoprofen ve ibuprofen varlığında metoprololün MIIP ve NIIP tarafından seçici bir şekilde tutulup tutulmayacağı incelendi. Şekil 71 MIIP'nin metoprolole olan seçici davranışını kanıtlamaktadır. Bölüm 3.5.3.7'deki duruma benzer şekilde, NIIP ise ketoprofen ve ibuprofene daha yüksek seçicilik gösterdi. Bu, ketoprofen ve ibuprofenin MIIP'deki metoprolole özgü boşluklara giremediği ve NIIP'nin yüzeyinde tutunduğunun göstergesidir.

Şekil 67-68 ve 70-71 birlikte değerlendirildiğinde, ketoprofen ve ibuprofen varlığında MIIP200'ün metoprolole olan seçiciliğinin MIIP'den daha yüksek olduğu söylenebilir.

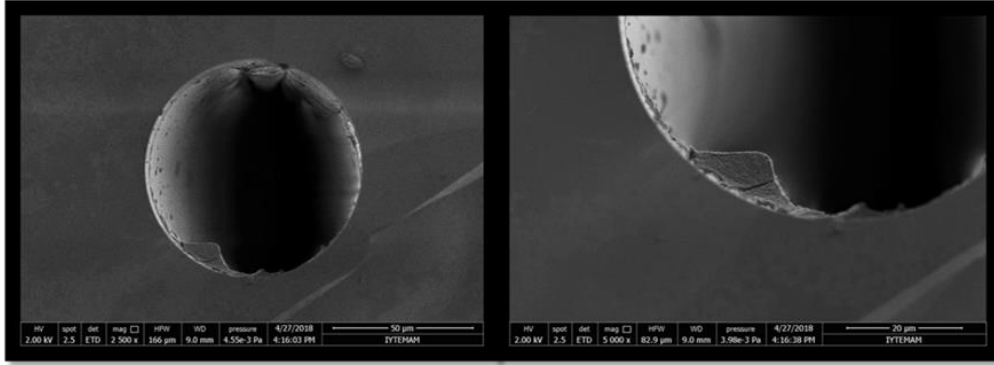


Şekil 71. MIIP'nin ketoprofen ve ibuprofen varlığında metoprolole seçiciliği

3.6 Kapiler Kolon Kaplama ve Karakterizasyonu

3.6.1 Sol-jel Yöntemiyle Kapiler Kolon Kaplama

Tablo 20'de özetlendiği şekilde, soğuk sentez ile üretilen modifiye edilmemiş silikanın (S2) SEM görüntüsü Şekil 72'de verilmektedir. İlgili bölümde de açıklandığı gibi, polimer çözeltisi CE cihazına takılı kapiler kolona enjekte edildi ve sentez işi de tamamlandı.

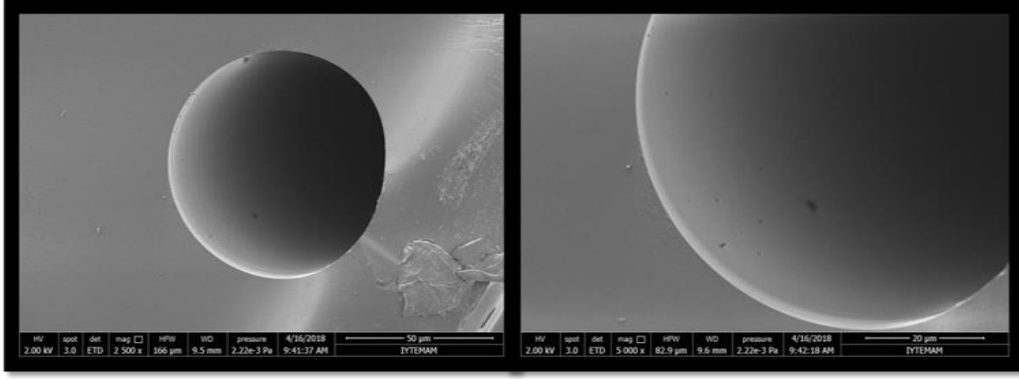


Şekil 72. Modifiye edilmemiş silika ile kaplanan kapiler kolonun SEM görüntüsü

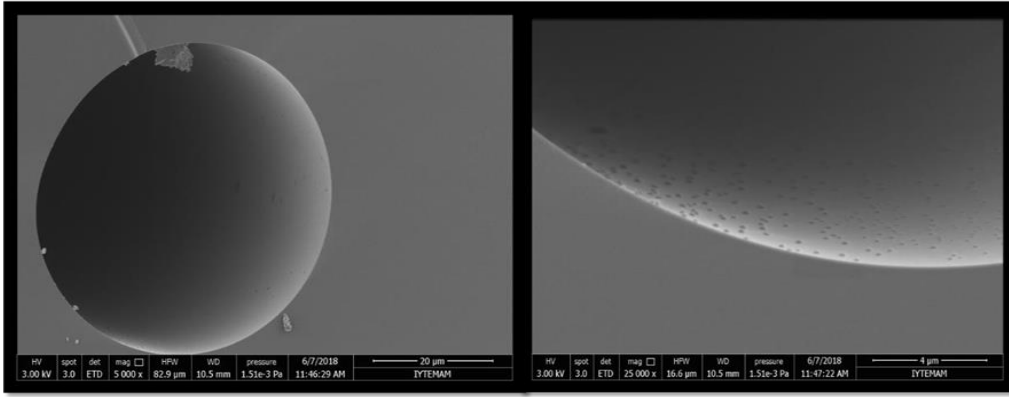
Kalan kolon geliştirme çalışmaları fiziksel morfolojiler açısından tatmin edici sonuçlar vermemiştir.

3.6.2 Moleküler Baskılama ile Kapiler Kolon Kaplama

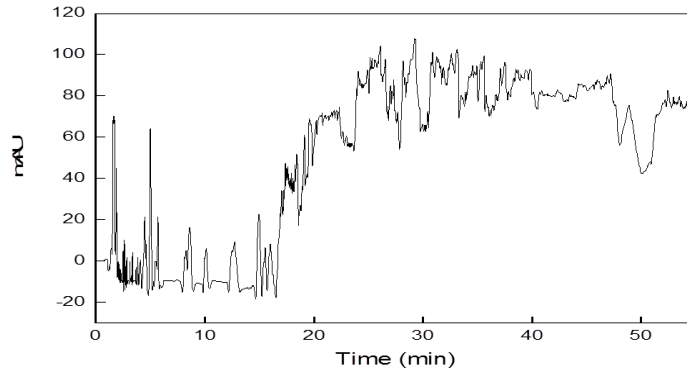
Boş kapiler kolon ve Tablo 20'de açıklandığı gibi hazırlanan kolonların SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 73 ve Şekil 74'te verilmektedir. Daha sonra ayrıntılı şekilde açıklanacağı gibi, proje süresi tamamlanmış olsa da kapiler kolonlarla ilgili çalışmalar devam etmektedir ve kazanılan tecrübe, farklı analitler için farklı kapiler kolonların hazırlanabileceğini göstermektedir. Şekil 74'e göre, kapiler kolon içinde ince bir kaplama (MIP3) vardır. Burada reaksiyon kolondan başlatıldı; MIP3, CE cihazının enjeksiyon sistemi kullanılarak kolona dolduruldu. Hazırlanan MIP3 kaplamalı kapiler kolon ile analiz yapıldı, ancak anlamlı bir elektrokromatogram elde edilemedi (Şekil 75 ve 76). Bunun, kolon dolgu maddelerinin yeterince stabil ve homojen bir şekilde kolona doldurulamamasından ve ayrıca kapiler kolondaki dedektörün okuma yaptığı açıklığın ölçüm yapılamayacak derecede polimer ile kaplanmış olmasından kaynaklanması muhtemeldir. Kaplamanın yeterince stabil olmaması durumunda çözgen geçişi sırasında zarar görmesi ve kopması (bleeding) da göz önünde bulundurulmalıdır. Şekil 75 ve 76 kararlı bir arkaplan sinyalinin olmadığı da göstermektedir.



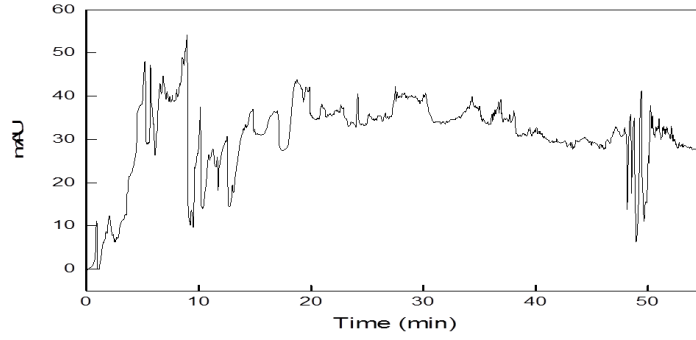
Şekil 73. Boş kapiler kolonun SEM görüntüsü



Şekil 74. MIP ile kaplanmış kapiler kolonun SEM görüntüsü

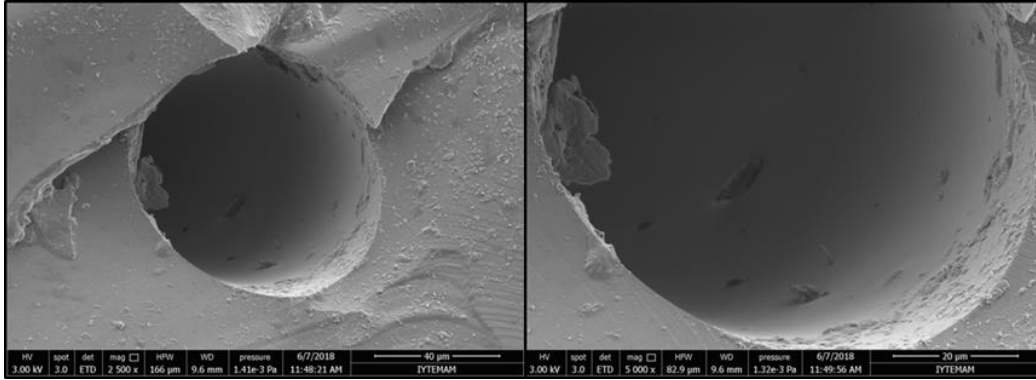


Şekil 75. 50.0 ppm'lik tiazid çözeltisinin elektroferogramı (MIP ile kaplanmış kapiler kolon)



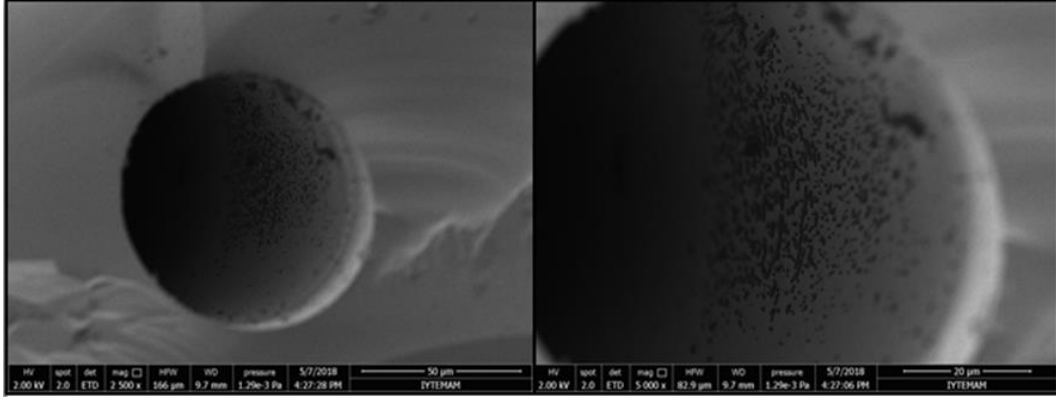
Şekil 76. 100.0 ppm'lik tiazid çözeltisinin elektroferogramı (MIP ile kaplanmış kapiler kolon)

MIP200 polimer çözeltisi ile doldurulan kapiler kolonun arakesiti Şekil 77'de gösterilmektedir. SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere homojen bir kaplama elde edilemedi. Homojen ve kararlı kaplama prosedürlerinin araştırılması ve denenmesine devam edilmektedir. Projenin final raporunun gönderilmesinden sonra da çalışmalar devam edecektir.



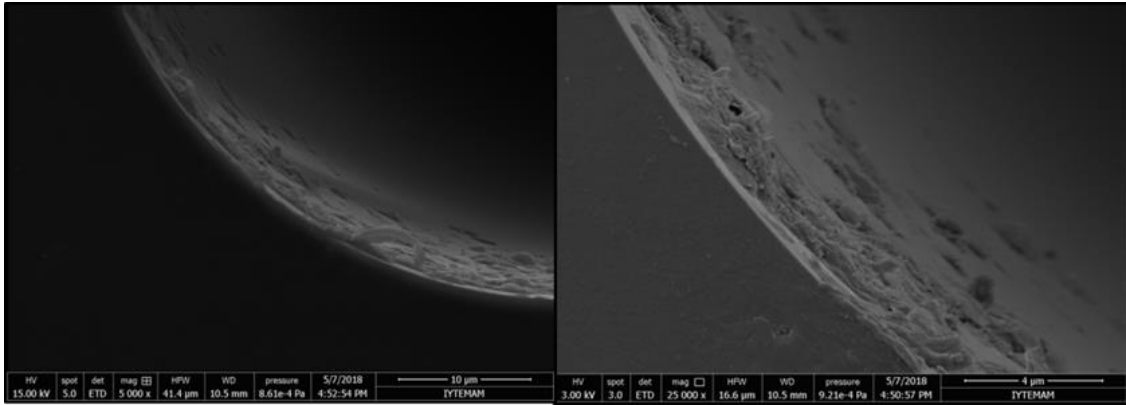
Şekil 77. MIP200 ile kaplanan kapiler kolonun kesiti; büyütme (a) 2.500x, (b) 5.000x

Şekil 78'de moleküler baskılanmış inorganik polimer (MIIP) kullanılarak hazırlanan kapiler kolonun enine kesiti görülmektedir. Kapiler kolonun çeperinde küresel parçacıklar şeklinde bir polimerleşme dikkat çekmektedir. Kapiler kolonun çeperindeki bu kaplama, açık tüpümsü kapiler kolon tipini akla getirmektedir. Hazırlanan polimer kapiler kolondan birkaç kez geçirildi ve yekpare bir kaplama elde edilmeye çalışıldı. Ancak, kolon içinde meydana gelen tıkanıklıktan dolayı kapiler kolon analiz için tekrar kullanılamadı.



Şekil 78. MIP ile kaplanan kapiler kolonun kesiti; büyütme (a) 2.500x, (b) 5.000x

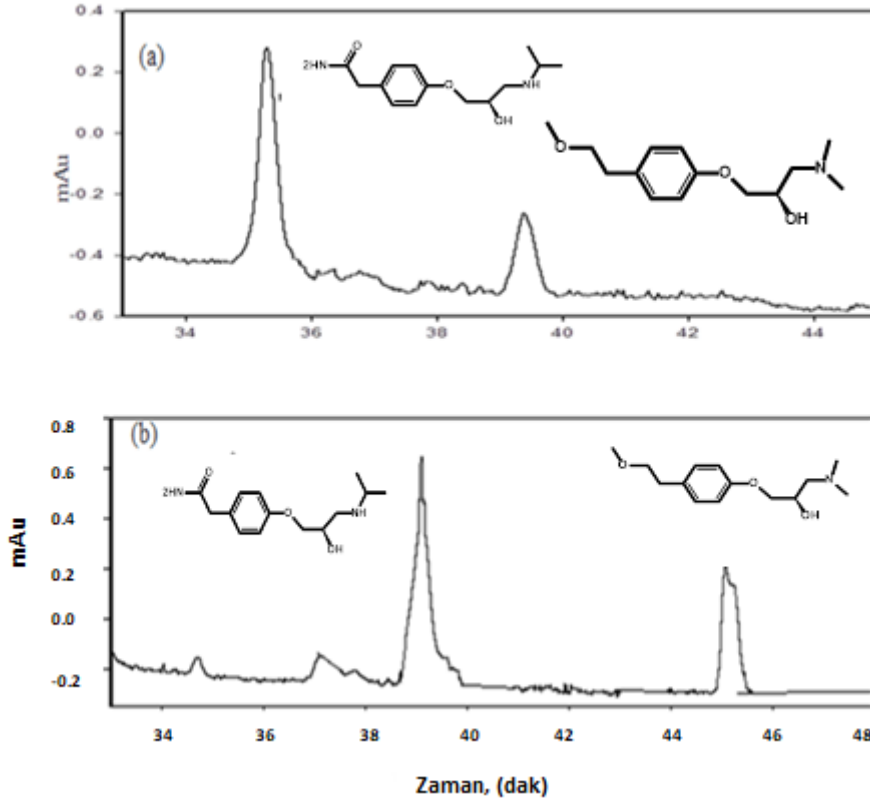
Şekil 79'daki kapiler kolon, MIP200 çözeltisinin kapiler elektroforez cihazı sistemine entegre edilmesi ile değil bir şırınga ile doldurulması yoluyla hazırlandı. Görüntülerden anlaşılacağı üzere burada gösterilen kaplama daha homojen görünmektedir. Şırınga ile doldurma 30.0 cm'lik kolonda başarılı olmadı ve analiz için kullanılamadı. Sonuçlar, polimerleşme ve kapiler kolon doldurma prosedürlerinin daha iyi optimize edilmesi gerektiğinin göstergesidir. Bu amaçla, özel bağlantı elemanları sipariş edildi ve yakın gelecek için kaplama planları yapıldı.



Şekil 79. MIP200 ile kaplanan kapiler kolonun kesiti; büyütme (a) 5.000x, (b) 25.000x

MIP200 ile kaplanan kolon kapiler elektroforez cihazına takıldı ve kapiler elektrokromatografi (CEC) sistemiyle denemeler yapıldı. Bu amaçla, 50.0 mg/L ve 100.0 mg/L metoprolol ve atenolol karışımı deionize su içerisinde hazırlandı. 10.0 mM borat tamponu (pH 9.5) elektrolit çözeltisi olarak kullanıldı. Kaplamanın bozulmaması veya basınç sebebiyle kolondan kopmaması için elektrokinetik enjeksiyon kullanıldı. Hazırlanan açık tüpümsü kapiler kolon kasete sabitlendi ve kaset sıcaklığı 25 °C olarak ayarlandı. Standart karışım farklı voltaj ve enjeksiyon sürelerinde kolona enjekte edildi. Alınan elektroferogramlar Şekil 79'da verilmektedir ve metoprolol ve atenololün birbirinden ayrılabilceğini ve ayrı ayrı tayin

edilebileceğini göstermektedir. Pik şekli, tutunma zamanı vb. parametrelerdeki değişim/kayma henüz optimize edilmedi ve kolon, kaplamanın stabil olmaması sebebiyle birkaç enjeksiyondan sonra kullanılmadı. Ancak, kaplama prosedürünün tamamen optimize edilmemiş olmasından kaynaklanan stabilite problemlerine rağmen elde edilen bu sonuç oldukça ümit vericidir ve bundan sonraki çalışmalar için yol göstericidir.

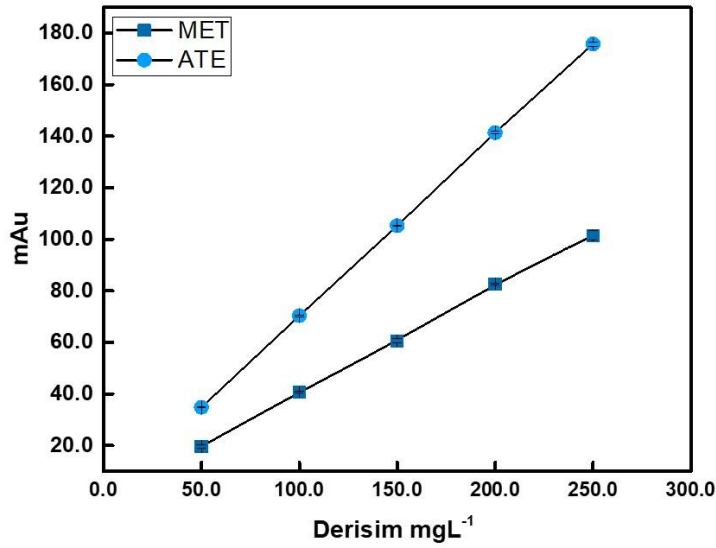


Şekil 80. CE cihazı içerisinde sıcaklık ile hazırlanan kolon kullanılarak elde edilen metoprolol ve atenolola ait elektroferogram. (a) 50.0 mg/L ve (b) 100 mg/L

Elektroferogramlardan da görüldüğü üzere (Şekil 80), metoprololün kolonda uzun tutulma süresi, kolonun metoprolole özgü spesifik tutunma alanlarına sahip olması ile açıklanabilir. Daha önemli sonuç ise yapısal olarak birbirine benzeyen iki analitin hazırlanan kapiler kolon ile birbirinden ayrılabilmesidir. Karşılaşılan en büyük problem kaplamanın homojen olmaması ve analitlerin kolonda kalma sürelerinin tutarsızlığıdır. Kolondaki homojen olmayan yapı her analizde aynı sonuçların alınmasının önünde bir engeldir ve tolere edilemez. Aynı amaçla kullanılan ticari kolon bulunamadığı için karşılaştırma yapılamadı. Çalışmaların devamında homojen kaplama yapabilmek için denemeler yapılacaktır.

Metoprolol ve atenolol için elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 81'de gösterilmektedir. Grafikler 300.0 mg/L'ye kadar doğrusal devam etmektedir. Dedeksiyon limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla 10.0 mg/L ve 32.02 mg/L'dir. Bu değerler biyolojik sıvılarda düşük analit

derişimleri belirlemeyi amaçlayan bir çalışma için yüksektir. Ancak, çalışmaların bu kısmı öncelikle metodun uygun olup olmadığını göstermek için yapıldı ve olumlu sonuçlar elde edildi. Devamında, geliştirilen kapiler kolon elektrokromatografi metodolojisinin kütle spektrometre gibi daha hassas bir dedeksiyon sistemi ile birleştirilmesi ve çok daha düşük metoprolol ve atenolol tayini için kullanılması hedeflendi. Kütle spektrometre ile planlanan deneyler, İYTE Çevre Ar-Ge Merkezindeki TOF-MS sisteminde meydana gelen arızanın uzun süredir giderilememesi sebebiyle henüz gerçekleştirilemedi. Kolonların tekrar kullanılabilirliğinde yeterli gelişme sağlanamadığı için diğer kurumlardaki kütle spektrometrelerin değerlendirilme yoluna gidilmedi.



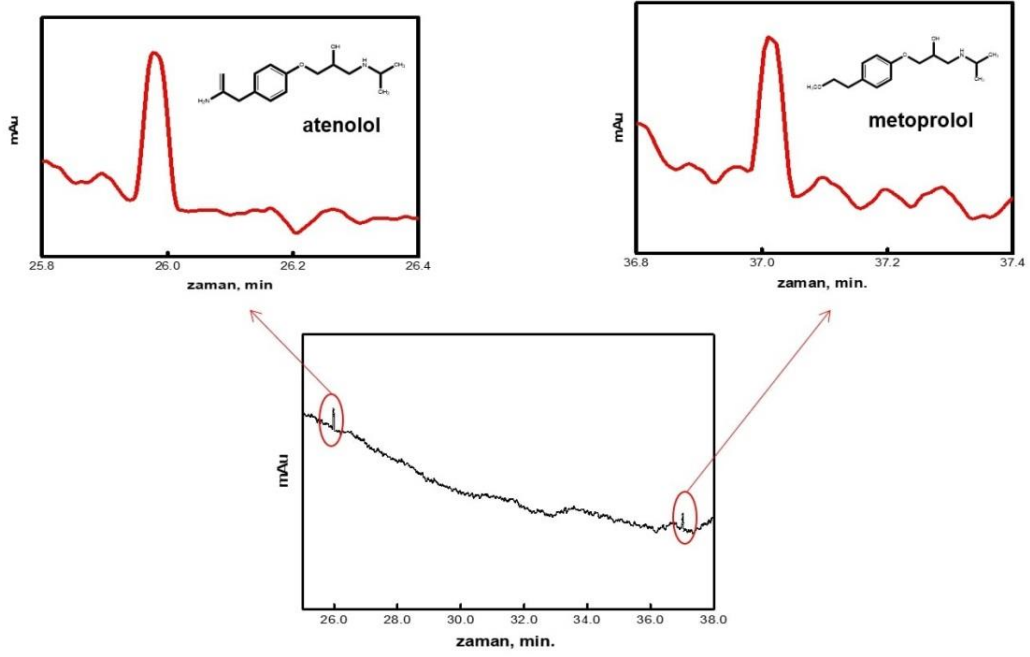
Şekil 81. Metoprolol ve atenolol için elde edilen kalibrasyon grafikleri (Agilent series 7100 Capillary Electrophoresis, kolon: Agilent series 75 mm MIP200 ile kaplanmış kolon, borat tampon derişimi: 10.0 mM, analit derişimi: 20.0 mg/L, dalga boyu: 225 nm).

Raporun çeşitli bölümlerinde belirtildiği gibi, CEC kolonları hazırlanırken polimerleşme aşamasında genellikle sıcaklık uygulandı. Ancak, sıcaklıkla başlatılan polimerleşmenin kontrolü zor olduğundan kolonlar sıklıkla tıkanı ve içinden çözelti geçirilmesinde genellikle sorun yaşandı. Bu durumda, uygulanan yüksek basınç da çözüm olmadı ve kolonun kırılmasına kadar giden ekstra problemler oluştu. Bu nedenle, polimerleşmenin kolon içinde başlatılması daha uygun bir yol olarak görüldü. Şablon molekül, monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcıdan oluşan karışım kolonun içine dolduruldu ve Bölüm 2.3.2'de belirtildiği şekilde UV kaynak altında polimerleşmesi sağlandı. UV kaynağı ile polimerleştirilen kaplamaya sahip kolon kullanılarak alınan elektroferogram Şekil 82'de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere, CE ile ayrılamayan metoprolol ve atenololün hazırlanan CEC kolonuyla rahatlıkla

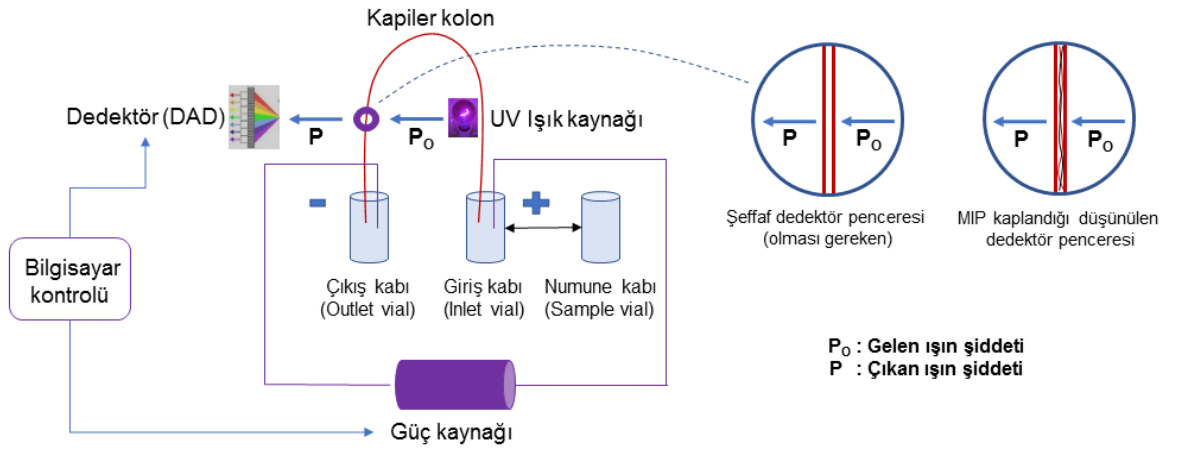
ayrılabilceği ve tayin edilebileceği anlaşılmaktadır. Sıcaklık kullanılarak (şekil 80) ve UV kaynağı kullanılarak (şekil 82) polimerleştirilen kaplamalara sahip kolonların elektroferogramları kıyaslandığında UV fotopolimerizasyon ile hazırlanan kolondaki gürültünün daha az olduğu görölmektedir. Ancak, nispeten az olmasına rağmen, gürültü seviyesinin yine de sinyali etkilediği söylenebilir. Sinyaldeki gürültünün önemli bir kısmının ışık kaynağı-dedektör kısmının da polimer tabakası ile kaplanmış olmasından kaynaklandığı düşünölebilir. CE sisteminde sıralı diyot dedektörü (DAD) kullanılmaktadır. Ölçüm sırasında UV ışını kapiler kolondan geçer ve çözeltinin absorbensı ölçölür (şekil 83). Ölçümün doğru sonuç vermesi için ışık-çözelti etkileşiminin olduğu pencerenin şeffaf olması gerekir. Bu deney için kapiler kolon Bölüm 2.3.2'de açıkladığı şekilde dolduruldu. İçi polimer çözeltisi ile doldurulan kolon UV ışınına maruz bırakıldı ve kolon çeperinin kaplanmasına çalışıldı. Bu çalışmada amaç sistemin çalışıp çalışmadığının; başka deyişle, kolon içinde kaplama olup olmayacağının ve varsa ayırım sağlayıp sağlayamayacağının belirlenmesi idi. UV ışını-dedektör penceresinde oluşabilecek kaplamanın oldukça ince olacağı ve kapiler borunun ölçüm penceresinde yeterli şeffaflık bulunacağı varsayıldı. Ancak, ölçümler sırasında gözlenen gürültü seviyesi benzer ölçümlere kıyasla daha yüksek olduğundan, muhtemel kaplamanın absorbens sinyalinı etkilediği söylenebilir.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında konunun daha hassasiyetle ele alınmasına karar verilmiştir. Kapiler kolondaki ölçüm penceresinin şeffaflığının sağlanması için ilk olarak UV polimerizasyon aşamasının kontrolü üzerinde durulmaktadır; bu sayede polimer kaplamanın ölçüm penceresine ulaşması engellenecektir. İkinci seçenek, ölçüm penceresinin olduğu kapiler kolonun analiz kolonundan ayrılması ve ölçüm öncesi uygun bağlantı parçalarıyla analiz kolonuyla birleştirilmesidir.

Sonuç olarak, metoprolol ve atenolol için elde edilen sinyaller (duyarlık) yeterince büyük olmasa da çözünürlük kabul edilebilir seviyededir ve bu bulgu bundan sonraki deneyler için oldukça ümit vericidir. Önceki paragrafta da belirtildiği gibi CEC için kolon hazırlama çalışmaları devam etmektedir.



Şekil 82. UV ışık kaynağı kullanılarak (fotopolimerizasyon) hazırlanan kolonla elde edilen metoprolol ve atenolole (50.0 mg/L) ait elektroferogram



Şekil 83. Kapiler elektroforez cihazı ve ölçüm sistemi



BÖLÜM 4

TARTIŞMA VE SONUÇ

Analiz türünden bağımsız, kimyasal analizin en önemli başlıklarından biri seçiciliktir. Seçiciliği arttırmak için çok sayıda metot geliştirilmiş ve geliştirilmektedir. Ayrıca, özellikle matriks etkisinin yoğun olduğu numunelerde analiti diğer analitlerden/matriksten ayırmak da uzun ve zahmetli süreçler gerektirebilmektedir.

Projede, üç farklı ilaç etken madde grubu için seçici sorbentler geliştirilmeye ve bu süreçte edinilen bilginin kapiler elektrokromatografi kolunu hazırlamada kullanılması amaçlanmıştır. Bu ifadeden hareketle, kapiler elektrokromatografide kullanılmak üzere geliştirilecek durağan fazın analit gruplarına seçiciliğine özel önem verilmiş ve kapiler kolonda kullanılacak kaplama malzemelerinin uygunluğu öncelikle sorpsiyon çalışmalarıyla CE ve HPLC ile kontrol edilmiştir. Kanser ilaçlarının tayini kapsamında öncelikle HPLC ve CE çalışmaları yapılmıştır. Gemsitabin maliyet nedeniyle bu gruptan çıkarılmış ve çalışmalara 5-florourasil ve 5-azasitidin ile devam edilmiştir. HPLC çalışmalarında mobil faz olarak 90:10 asetonyitril:su (pH: 5.0, 0.8 mL/min akış hızı) uygulanmış ve C30 kolonu ile bir metot oluşturulmuştur. 5-florourasil için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.73 ve 2.4 mg/L olarak hesaplanmıştır. CE çalışmalarında kullanılan parametreler ise 20 kV voltaj (6.0 W, 300 µA), 10.0 mM borat tamponu (pH 11.5), 50.0 mbar enjeksiyon basıncı (10.0 s), 30.0 °C kaset sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında elde edilen LOD ve LOQ değerleri, 5-florourasil için sırasıyla 0.188 ve 0.63 mg/L, 5-azasitidin için ise sırasıyla 0.177 ve 0.590 mg/L olarak hesaplanmıştır.

5-florourasil için beş farklı 'şablon molekül:monomer:çapraz bağlayıcı' oranında moleküler baskılanmış polimer sentezlenmiştir (1:1:20 AA, 1:4:20 AA, 1:8:20 AA, 1:8:20 MA, 1:8:10 AA). Hazırlanan sorbentler içinde akrilamid (AA) ile 1:1:20 oranında sentezlenen polimer en iyi sorpsiyon sonuçlarını verdiği için sonraki çalışmalarda bu malzeme kullanılmıştır. Polimerin sorpsiyon performansını geliştirmek için deneysel parametreler optimize edilmiş, çözelti pH'sı, sorbent miktarı ve çalkalama süresi sırasıyla 5.0, 100 mg ve 60.0 min olarak belirlenmiştir. Seçicilik ve yeniden sorpsiyon performansları karşılaştırılmış, baskılanmış polimerin sorpsiyon kabiliyetinin baskılanmamış polimere göre daha iyi olduğu belirlenmiştir.

Diüretik ilaç etken maddeleri için CE analizinin optimum parametreleri, 25 kV voltaj (6.0 W, 300 µA), 10.0 mM borat tamponu (pH 9.4), 50.0 mbar enjeksiyon (10.0 s), 30.0°C kaset sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında BFT, HCT ve CT'nin kalibrasyon grafikleri elde edilmiş, dedeksiyon limiti (LOD) 0.20 mg/L ile 0.30 mg/L ve tayin limiti (LOQ) 0.44 mg/L ile 0.99 mg/L arasında bulunmuştur. İlgili kaynaklarda belirtildiği üzere, diüretikler için WADA tarafından belirlenen Minimum Required Performance Level (MRPL) 0.2 mg/L'dir.

CE ile elde edilen sonuçlar WADA'nın belirlediği derişimlere oldukça yakındır ve bundan sonra yapılacak iyileştirmelerle bu amaçla kullanılabilir. Ayrıca, CEC çalışmaları devam etmektedir ve hazırlanacak kapiler kolonlarla diüretiklerin birbirinden ayrılması ve daha hassas şekilde tayin edilmesi beklenmektedir.

Diüretiklerle yapılan sorpsiyon çalışmalarında kullanılan sorbentlerin sentezinde iki farklı metodoloji, sol-jel ve moleküler baskılama, kullanılmış ve sorpsiyon kapasiteleri açısından her biri kendi sınıfında karşılaştırılmıştır.

Silikat yapıların sentezi, tek adımdan oluşan Stöber işleminin modifikasyonu ve sol-jel yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, silika yüzeyi ve analit molekülleri arasında H-bağı oluşturmak ve π - π istiflemesi yapmak için sorbent yüzeyi 3-APTES ve TEPS ile modifiye edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, modifiye edilmemiş silikanın tüm analitler (BFT, HCT, CT) için en yüksek sorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Böylece sol-jel grubu içinde, modifiye edilmemiş silika, kapiler kolon için kaplama malzemesi/durağan faz olarak seçilmiştir. Moleküler baskılanmış polimerler, organik ve inorganik öncüller kullanılarak hazırlanmıştır. Organik öncüller ile elde edilen MIP ve bunun körü olan NIP kendi aralarında, inorganik öncüller ile elde edilen MIIP ve bunun körü olan NIIP de kendi aralarında sorpsiyon kapasiteleri (Q değeri) hesaplanarak ve analitlere seçiciliklerine bakılarak kıyaslanmıştır.

Diüretikler arasından BFT'nin moleküler baskılanmış sorbentleri bu maddeyi seçici olarak tanıması için sentezlenmiştir. Sonuçlar, MIP'nin, BFT'ye spesifik bağlanma boşluklarına sahip olması nedeniyle NIP'e göre daha yüksek sorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, MIP'nin BFT'nin seçici tayini için kullanılabilceği de yapısal olarak benzer CT ve HCT molekülü varlığında çalışılarak kanıtlanmıştır.

Beta bloker ilaç etken maddeleri için, CE analizinin optimum parametreleri; 20.0 kV voltaj (6.0 W, 300 μ A), 25.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 50.0 mbar enjeksiyon basıncı (5.0 s), 30.0 °C kaset sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında metoprolol için kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Metoprolol için LOD 0.22 mg/L, tayin limiti ise 0.73 mg/L olarak hesaplanmıştır.

Beta-blokerler için planlanan çalışmalarda, kaplama malzemelerinin (sorbent ve durağan faz) sentezi, geliştirilen malzemelerin sorpsiyon çalışmaları ile uygunluk kontrolü ve malzemenin kolona doldurulması olarak üç ana rota oluşturulmuştur. Dolgu malzemesi olarak moleküler baskılanmış organik-inorganik polimerler ve sol-jel yöntemi ile nano düzeyde silika partikül sentezlenmiştir. İlk aşamada, farklı morfolojilere sahip metoprolol baskılanmış polimerler hazırlanmıştır. Yekpare ve nanopartikül boyutunda sentezlenen sorbentlerin sorpsiyon kapasitesi, aynı koşullar altında sentezlenen NIP'leri ile kıyaslanmıştır. Mikro partikül (MIP200/NIP200) yapısındaki polimerlerin düşük analit derişimlerinde daha iyi sorpsiyon göstermesi nedeniyle çalışmaya bu polimerle devam edilmiştir. Seçilen MIP200/NIP200

polimerlerinin seçicilik deneyleri ketoprofen ve ibuprofen varlığında gerçekleştirilmiş ve MIP200'ün metoprololle karşı daha yüksek seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur. Sentezlenen ikinci sorbent türü, moleküler baskılanmış inorganik polimer ve onun körü olan baskılanmamış moleküler inorganik polimerdir (MIIP/NIIP). Yapılan geri bağlanma deneylerinde MIIP'nin NIIP'ye göre daha yüksek sorpsiyon kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Ketoprofen ve ibuprofen varlığında gerçekleştiren seçicilik deneylerinde ise MIIP'nin metoprololle karşı seçiciliği ortaya konmuştur. MIP200 ile kıyaslandığında MIIP'nin, girişimci olarak çözeltiye eklenen ketoprofen ve ibuprofeni daha yüksek oranda tuttuğu, ancak daha önemli olan metoprololle olan seçicilikte MIP200'ün çok daha etkili olduğu gösterilmiştir. Yüzeyi herhangi bir fonksiyonel grupla işlevselleştirilmemiş silika nanoparçacıklar 3. sorbent tipi olarak kullanılmış ve metoprololle özgü bağlanma alanları oluşturulmadığı için bağlanmanın yüzeyde gerçekleştiğine hüküm verilmiştir. Sentezlenen sorbentler ile yapılan sorpsiyon çalışmalarında en iyi sonucu veren MIP200 ile hazırlanan kapiler kolon betablokerlerin ayrımı ve tayini için kullanılmıştır.

Kolon geliştirme aşamasında en başarılı sonuçlar MIP200 ile hazırlanan kolon ile elde edilmiştir. CE'de ayrılmayan metoprolol ve atenolol hem cihaz içinde hazırlanan hem de UV kaynağı (fotopolimerizasyon) ile geliştirilen kolon kullanılarak CEC'de ayrılmıştır. Kapiler elektrokromatografi (CEC) analizinin optimum parametreleri; 20.0 kV voltaj (6.0 W, 300 μ A), 10.0 mM borat tamponu (pH 9.5), 20.0 kV enjeksiyon voltajı (5.0 s) ve 25.0 °C kaset sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Metoprolol için LOD 10.0 mg/L, LOQ 32.0 mg/L olarak hesaplanmıştır.

CEC analizinde, geliştirilen kolonlar ile alınan sonuçlarda tekrarlanabilirlik sorunları vardır. Kullanılan yöntemlerden biri olan şırınga ile doldurma işlemi sırasında kolon sık sık tıkanmış için bazı deneyler tekrar edilememiştir. CE cihazının kendi enjeksiyon sistemini kullanarak doldurmak; uygulama pratiği, madde tasarrufu ve kontrol edilebilirlik açısından daha uygun bir yol olduğu için seçilmiştir. Gürültülü arkaplan, elektroferogramda karışıklığa sebep olmuş ve pik tanımlamada zorluk yaşanmıştır. Dedeksiyon gözünün tıkanabileceği düşüncesi ile, geliştirilen bazı kolonlar, boş kapiler kolonlar ve uygun ara parçalar kullanılarak birleştirilmeye çalışılmıştır. Başarılı olunan birleştirilmiş kolonlarla analiz yapılmış, ancak süregelen gürültülü arkaplan sorunu, kolon kaplamasındaki fonksiyonel grupların yüzeyden koptuğuna (column bleeding) dair güçlü bir kanıt oluşturmuştur. Uygulanan diğer kolon kaplama stratejisi UV ışık kaynağı ile fotopolimerizasyondur. Cihazın enjeksiyon sistemi kullanılarak hazırlanan kolonlarla kıyaslandığında arkaplandaki gürültünün daha az olduğu söylenebilir. Piklerin çözünürlüğü iyi olmakla birlikte duyarlık yeterli değildir. Bu, UV ışık kaynağından çıkan ısıdan dolayı, açılan gözde (kapiler kolonun ölçüm penceresi) az da olsa bir polimerleşmenin olduğunu düşündürmektedir. Yine de gelinen nokta oldukça ümit verici olarak değerlendirilmiştir.



CEC kolonun geliştirilmesine devam edilmektedir ve sonraki adımda CE cihazı ile kütle spektrometrenin (MS) birleştirilmesi planlanmaktadır. Dedektör olarak MS kullanıldığında duyarlılıkla ilgili bir sorun kalmayacağı söylenebilir. Bu konuda şu ana kadar çalışma yapılamamasının sebebi, CEC kolonu geliştirme prosesinin zorluğu yanında kullanılması planlanan Çevre Ar-Ge'deki TOF-MS'in uzun bir süredir arızalı olmasıdır. Diğer kurumlarda bulunan kütle spektrometre detektörüne başvurulmamasının sebebi, HPLC-DAD ve CE/CEC-DAD ile elde edilen deney sonuçlarının yeterli hale gelmesinin beklenmesidir.

Belirlenen analit grupları için ticari CEC kolonları bulunamamıştır. Bu nedenle karşılaştırmalar mevcut (boş) CE kolonları ile yapılmıştır.



REFERANSLAR

Agilent Technologies. 2014. "High Performance Capillary Electrophoresis." Agilent Technologies, accessed 13 May 2018.

https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990_3777EN.pdf. Son erişim tarihi: 08 Aralık 2018.

Ali, I., Haque, A., Wani, W.A., Saleem, K., ve Al Za'abi, M., 2013. "Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review", *Biomedical Chromatography*, 27,1296-1311.

Baranowska,I., Magiera,S.,Baranowski,J.2011."UHPLC method for simaltenous determination of β -blockers,isoflavones and their metabolites in human urine",*Journal of Chromatography B*,879,615-626.

Barbosa, J., Barron, D., Beltran, J.L., Buti, S.. 1998. "On the role of solvent in acid–base equilibria of diuretics in acetonitrile–water mixed solvents." *Talanta* 45 (5):817-827.

Bartle, K.D., Carney, R.A., Cavazza, A., Cikalo, M.G., Myers, P., Robson, M.M., Roulin, S.C.P., Sealey, K.. 2000. "Capillary electrochromatography on silica columns: factors influencing performance." *Journal of Chromatography A* 892:279–290. doi: S0021-9673(00)00150-3.

Bartle, K.D., ve Myers, P. 2001 "Capillary Electrochromatography", *RSC Chromatography monographs*.

Bedair, M., and Z. El Rassi. 2004. "Recent advances in polymeric monolithic stationary phases for electrochromatography in capillaries and chips." *Electrophoresis* 25 (23-24):4110-4119.

Boyaci, E., A. Cagir, T. Shahwan, and A. E. Eroglu. 2011. "Synthesis, characterization and application of a novel mercapto- and amine-bifunctionalized silica for speciation/sorption of inorganic arsenic prior to inductively coupled plasma mass spectrometric determination." *Talanta* 85 (3):1517-25

Bristow, M. R. 2000. "beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure." *Circulation* 101 (5):558-569.

Brueckner, B., Rius, M., Markelova, M.R., Fichtner, I., Hals, P.A., Li, M., Sandvold, ve Lyko, F.2010. "Delivery of 5-Azacytidine to Human Cancer Cells by Elaidic Acid Esterification Increases Therapeutic Drug Efficacy", *Molecular Cancer Therapeutics*, 9, 1256–1264.

Cheong, W. J., Ali, F., Kim, Y. S., ve Lee, J. W.2013. "Comprehensive overview of recent preparation and application trends of various open tubular capillary columns in separation science." *J Chromatogr A* 1308:1-24.

Cleophas, T. J. M., and R. B. Kalmansohn. 1995. "New arguments in favour of cardioselective β -blockers." *The Netherlands Journal of Medicine* 47 (6):308-310.

Çetin,K., Denizli, A. 2015."5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs",*Colloids and Surface B: Biointerfaces*,126,401-406.

Danks, A. E., S. R. Hall, and Z. Schnepf. 2016. "The evolution of 'sol–gel' chemistry as a technique for materials synthesis." *Mater. Horiz.* 3 (2):91-112.



- Deng, C., Zhong, Y., He, Y., Ge, Y. ve Song, G. 2015. "Selective determination of trace bisphenol a using molecularly imprinted silica nanoparticles containing quenched fluorescent silver nanoclusters." *Microchimica Acta* 183 (1):431-439.
- Derazshamshir, A., Yılmaz F., Denizli, A. 2015. "Molecularly imprinted hydrophobic polymers as a tool for separation in capillary electrochromatography" *Anal. Methods.*, 7, 2659.
- Deventer, K., G. Baele, P. Van Eenoo, O. J. Pozo, and F. T. Delbeke. 2009. "Stability of selected chlorinated thiazide diuretics." *J Pharm Biomed Anal* 49 (2):519-24.
- Deventer, K., O. J. Pozo, P. Van Eenoo, and F. T. Delbeke. 2009. "Detection of urinary markers for thiazide diuretics after oral administration of hydrochlorothiazide and altizide-relevance to doping control analysis." *J Chromatogr A* 1216 (12):2466-73.
- Eeltink, S., and W. T. Kok. 2006. "Recent applications in capillary electrochromatography." *Electrophoresis* 27 (1):84-96.
- Eeltink, S., Rozing, G. P. ve Kok, W. T. 2003. "Recent applications in capillary electrochromatography." *Electrophoresis* 24 (22-23):3935-61.
- Fitch, K. 2012. "Proscribed drugs at the Olympic Games: permitted use and misuse (doping) by athletes." *Clinical Medicine* 12 (3):257-260.
- Florea, A., Guo, Z., Cristea, C., Bessueille, F., Vocanson, F., Goutaland, F., Dzyadevych, S., Săndulescu, R., ve Renault, N.J. 2015. "Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework", *Talanta*, 138, 71-76.
- Ganzera, M., Nischang, I. 2010. "The Use of Capillary Electrochromatography for Natural Product Analysis – Theoretical Background and Recent Applications." *Current Organic Chemistry* 14 (16):1769-1780.
- Goebel, C., Trout G. J., ve Kazlauskas, R. 2004. "Rapid screening method for diuretics in doping control using automated solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* 502 (1):65-74.
- Hench Larry L., Jon K. West. 1990. "The sol-gel process." *Chemical Reviews* 90 (1):33-72.
- Hernando, M.D., Gomez M.J., Agüera, A., Fernandez-Alba, 2007. A.R. "LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in waste water and surface water", *Trends in Analytical Chemistry*, 26
- Hjerten, S. J. *Chromatogr.* 1985, 347, 191-195.
- Ho, T-T., Li Z-G, Lin H-Y and Lee M-R. 2013. "Determination of Diuretics in Urine Using Immobilized Multi-Walled Carbon Nanotubes in Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Combined with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of the Chinese Chemical Society* 60 (8):1033-42.
- Hsu K. F., Chien K-Y, Chang-Chien G. P., Lin S. F., Hsu P. H. and Hsu M-C. 2011. "Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Screening Method for the Simultaneous Detection of Stimulants and Diuretics in Urine." *Journal of Analytical Toxicology* 35 (9):665-674.



Iacob, B. C., E. Bodoki, and R. Oprean. 2014. "Recent advances in capillary electrochromatography using molecularly imprinted polymers." *Electrophoresis* 35 (19):2722-32.

Jiskra, J. 2002. *Capillary Electrochromatography Fundamentals and Applications*: Eindhoven : Technische Universiteit Eindhoven.

Junjie, L., Y. Mei, H. Danqun, H. Changjun, L. Xianliang, W. Guomin, and F. Dan. 2013. "Molecularly imprinted polymers on the surface of silica microspheres via sol-gel method for the selective extraction of streptomycin in aqueous samples." *J Sep Sci* 36 (6):1142-8.

Ladage, Dennis, Robert H. G. Schwinger, and Klara Brixius. 2013. "Cardio-Selective Beta-Blocker: Pharmacological Evidence and Their Influence on Exercise Capacity." *Cardiovascular Therapeutics* 31 (2):76-83.

Loffing, J. 2004. "Paradoxical antidiuretic effect of thiazides in diabetes insipidus: another piece in the puzzle." *J Am Soc Nephrol* 15 (11):2948-50.

Lu, M., Zhang, L., Qiu, B., Feng, Q., Xia, S., Chen, G. 2008. "Rapid separation and sensitive detection for β -blockers by pressure-assisted capillary electrochromatography-electrospray ionization mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, 1193, 156-163.

Luis, M. 2002. "Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of diuretics in pharmaceutical formulations." *Talanta* 57 (2):223-31

Lv, Yun-Kai, Li-Min Wang, Shuai-Lei Yan, Xiao-Hu Wang, and Han-Wen Sun. 2012. "Synthesis and characterization of molecularly imprinted poly(methacrylic acid)/silica hybrid composite materials for selective recognition of lincomycin in aqueous media." *Journal of Applied Polymer Science* 126 (5):1631-1636.

Morante-Zarcelero, S., and I. Sierra. 2012b. "Simultaneous Enantiomeric Determination of Propranolol, Metoprolol, Pindolol, and Atenolol in Natural Waters by HPLC on New Polysaccharide-Based Stationary Phase using a Highly Selective Molecularly Imprinted Polymer Extraction." *Chirality* 24 (10):860-866.

Morra, V., P. Davit, P. Capra, M. Vincenti, A. Di Stilo, and F. Botre. 2006. "Fast gas chromatographic/mass spectrometric determination of diuretics and masking agents in human urine: Development and validation of a productive screening protocol for antidoping analysis." *J Chromatogr A* 1135 (2):219-29.

Mu, L. N., Z. H. Wei, and Z. S. Liu. 2015. "Current trends in the development of molecularly imprinted polymers in CEC." *Electrophoresis* 36 (5):764-72.

Olcer, Y. A., M. Demirkurt, M. M Demir, and A. E. Eroglu. 2017. "Development of molecularly imprinted polymers (MIPs) as a solid phase extraction (SPE) sorbent for the determination of ibuprofen in water." *RSC Advances* 7 (50):31441-31447.

Procházková, A., Liu, S., Friess, H., Aebi, S. ve Thormann, W.A. 2001. "Determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-29-deoxyuridine-59-monophosphate in pancreatic cancer cell line and other biological materials using capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography*, 916, 215-224.



- Sarafraz-Yazdi, Ali, and Nourolhoda Razavi. 2015. "Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 73:81-90.
- Schäfer, A., Schomacher, L., Barreto, G., Döderlein, G. ve Niehrs, C.2010. "Gemcitabine functions epigenetically by Inhibiting repair mediated DNA Demethylation", *PLoS One* , 5, 14060.
- Schappler, J., D. Guillarme, S. Rudaz, and J. L. Veuthey. 2008. "Microemulsion electrokinetic chromatography hyphenated to atmospheric pressure photoionization mass spectrometry." *Electrophoresis* 29 (1):11-9.
- Schubert, U., and N. Hüsing. 2000. *Synthesis of Inorganic Materials*: Wiley.
- Sellergren, B. 2000. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*: Elsevier Science.
- Siren, H., R. Shimmo, P. Sipola, S. Abenet, and M. L. Riekkola. 2008. "Capillary electrophoresis of diuretics and probenecid in methanol." *J Chromatogr A* 1198-1199:215-9.
- Smith, N. 1999. *Capillary ElectroChromatography*. California: Beckman Coulter.
- Sun, H., Wu, Y., He, P., Zuo, Y. ve Lv, Y.2012." Characterization of interaction between antitumor drug 5-fluorouracil and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis", *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1):, 75–79.
- Tanret, I., D. Mangelings, and Y. V. Heyden. 2009. "Monolithic Stationary Phases in Classic and Chiral Pharmaceutical Analysis with CEC and pCEC." *Journal of Chromatographic Science* 47 (6):407-417.
- Tarongoy, F. M., Haddad, Jr., P. R., Boysen, R. I., Hearn, M. T. ve Quirino, J. P.. 2016. "Open tubular-capillary electrochromatography: Developments and applications from 2013 to 2015." *Electrophoresis* 37 (1):66-85.
- Tsuchiya, H., and M. Mizogami. 2013. "Characteristic interactivity of landiolol, an ultra-short-acting highly selective beta(1)-blocker, with biomimetic membranes: comparisons with beta(1)-selective esmolol and non-selective propranolol and alprenolol." *Frontiers in Pharmacology* 4.
- Tunç, Y., Gölgelioğlu, Ç., Ulubayram, K., Tuncel, A.2012. "Polystyrene-Based High Internal Phase Emulsion Polymer Monolithic Stationary Phase for Capillary Electrochromatography", *Separation Science and Technology*, 47:16, 2444-2449.
- Ventura R. Ve Segura J. 1996. "Detection of diuretic agents in doping control." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 687 (1):127-44.
- Ventura, R. , Nadal T., Alcalde P., Pascual J.A., and Segura J. 1993. "Fast Screening Method for Diuretics, Probenecid and Other Compounds of Doping Interest." *Journal of Chromatography A* 655 (2):233-42.
- Wackerlig, J., and R. Schirhagl. 2016. "Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review." *Analytical Chemistry* 88 (1):250-261.



WADA (World Anti-Doping Agency). "The World Anti-Doping Code, The 2015 Prohibited List International Standard" . <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-2015-prohibited-list-en.pdf>, Son Erişim Tarihi: 7 Aralık 2018.

WADA. 2018a. "PROHIBITED LIST DOCUMENTS." <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list-documents>. Son Erişim Tarihi: 11 Mayıs 2018.

WADA. 2018b. "Technical Document – TD2018MRPL." https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018mrpl_v1_finaleng.pdf. Son Erişim Tarihi: 11 Mayıs 2018.

Wei, Ze-Hui, Xi Wu, Bian Zhang, Rui Li, Yan-Ping Huang, and Zhao-Sheng Liu. 2011. "Coatings of one monomer molecularly imprinted polymers for open tubular capillary electrochromatography." *Journal of Chromatography A* 1218 (37):6498-6504.

Wu, R., L. G. Hu, F. J. Wang, M. L. Ye, and H. Zou. 2008. "Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation." *Journal of Chromatography A* 1184 (1-2):369-392.

Wu, Z., H. Xiang, T. Kim, M. S. Chun, and K. Lee. 2006. "Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane." *J Colloid Interface Sci* 304 (1):119-24

Yan, H. Y., and K. H. Row. 2006. "Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer." *International Journal of Molecular Sciences* 7 (5-6):155-178.

Zaidi, S.A., Lee, S.M., Cheong, W.J. 2011. "Open tubular capillary columns with basic templates made by the generalized preparation protocol in capillary electrochromatography chiral separation and template structural effects on chiral separation capability", *Journal of Chromatography A*, 1218.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. AHMET EMİN EROĞLU
Proje No:	215Z205
Proje Başlığı:	Çeşitli İlaç Etken Maddelerinin Kapiler Elektrokromatografi İle Tayini İçin Yeni Kapiler Kolonlar Geliştirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	ENGİN KARABUDAK, ÜMİT HAKAN YILDIZ
Danışmanlar:	ALİ ÇAĞIR
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. KİMYA B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2016 - 15/10/2018
Onaylanan Bütçe:	581561.0
Harcanan Bütçe:	484929.89
Öz:	<p>Projenin amacı, üç farklı ilaç etken madde grubundan beta-blokerler (metoprolol ve atenolol), anti-kanser ilaçları (5-florourasil ve azasitidin) ve diüretik ilaçların (bendroflumetiazid, klorotiazid ve hidroklorotiazid), kapiler elektroforez ve kapiler elektrokromatografi ile tayini için yeni metotlar geliştirilmesidir. İlk çalışmada, anti kanser ilaçların etken maddesi olan 5-florourasil ve 5-azasitidin için farklı formülasyonlara (farklı fonksiyonel monomerler, porojenler ve monomer:çapraz bağlayıcı oranları) sahip moleküler baskılanmış polimerler (MIP) sentezlendi. Çözelti pH'sı, çalkalama süresi, sorbent miktarı gibi parametreler optimize edildi ve bu koşullarda 5-FU ve 5AC için dedeksiyon limit (LOD) değerleri sırasıyla 0.40 mg/L ve 0.28 mg/L ve tayin limit (LOQ) değerleri 1.33 mg/L ve 0.92 mg/L olarak hesaplandı. İkinci çalışmada, analit grubu olarak seçilen tiazidlerin belirlenmesinde kullanılacak kapiler elektrokromatografi kolonu hazırlanması için sol-jel kimyası ve moleküler baskılama tekniği kullanıldı. Modifiye silika sol-jeller (amin- ve fenil-modifiye) ve farklı MIP materyalleri (inorganik- ve organik-bazlı) durağan faz kaplama malzemesi olarak kullanılmak için sentezlendi. Kolon içine yüklenecek maddenin seçimi için kapiler elektroforez (CE) öncesinde sorpsiyon çalışması yapıldı. Kritik deneysel parametreler optimize edildi; elektrolit çözeltisi olarak pH'sı 9.4'e ayarlanmış 10.0 mM borat seçildi. Çalışma voltajı 25 kV, kaset sıcaklığı 30.0 °C'ye sabitlendi. LOD değerleri 0.20 mg/L ile 0.30 mg/L, LOQ değerleri 0.44 mg/L ile 0.99 mg/L arasında bulundu. Çalışmanın üçüncü kısmında, β-blokerlerin tayini için moleküler baskılanmış organik-inorganik polimerler ve sol-jel metoduyla silikat nanopartikülleri sentezlendi ve kapiler elektrokromatografi kolonunda kaplama/dolgu malzemesi olarak kullanıldı. Sentezlenen üç farklı sorbentin sorpsiyon performansı kıyaslandı. Moleküler baskılanmış organik polimerlerin metoprolole yüksek sorpsiyon kapasitesi ve seçicilik gösterdiği belirlendi. Durağan faz optimizasyon çalışmalarından sonra CEC kolonu geliştirildi ve analitik performansı incelendi. Söz konusu kolonla yapılan çalışmalarda metoprolol için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 10.0 mg/L ve 32.0 mg/L olarak hesaplandı.</p>
Anahtar Kelimeler:	Kapiler Elektrokromatografi, Kapiler Elektroforez, MIP
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır